

## TESIS

# PENGARUH HESPERITIN TERHADAP FUNGSI PENETRASI SPERMATOZOA MENCIT SECARA *IN VIVO* DAN *IN VITRO*

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK

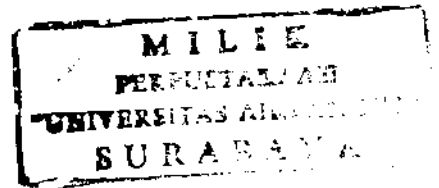


SUSIE AMILAH

PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2000

**PENGARUH HESPERITIN TERHADAP  
FUNGSI PENETRASI SPERMATOZOA MENCIT  
SECARA *IN VIVO* DAN *IN VITRO***

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**



**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister dalam  
Program Studi Ilmu Farmasi  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh:

**SUSIE AMILAH**  
NIM : 099712644.M.

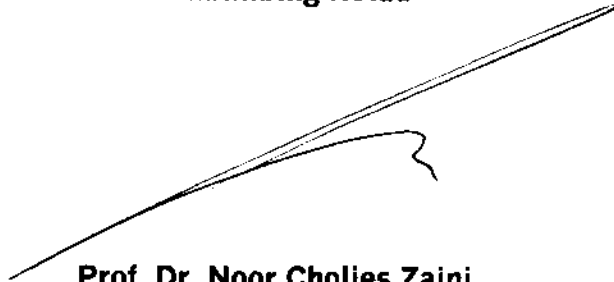
**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2000**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**TESIS INI TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL:**

**Oleh**

**Pembimbing Ketua**

A long, sweeping handwritten signature in black ink, starting from the bottom left and extending towards the top right, ending in a small loop.

**Prof. Dr. Noor Cholies Zaini  
NIP: 130355372**

**Pembimbing**

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping, stylized loops and strokes, positioned above the name.

**Dr. Mulya Hadi Santosa Apt.  
NIP: 130809094**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur Alhamdulillah saya panjatkan kehadiran Allah SWT, karena hanya berkat rahmat-Nya saya telah menyelesaikan seluruh penelitian serta penulisan tesis ini. Tesis ini disusun berdasarkan hasil penelitian selama 5 bulan yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian hesperitin baik secara *in vivo* maupun *in vitro* terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit. Namun demikian penelitian ini tidak akan selesai tanpa bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, untuk ini saya dengan tulus menyampaikan rasa terima kasih.

Terima kasih saya ucapkan kepada :

1. Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini, selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu dan memberikan bimbingan dalam penelitian dan penyelesaian tesis ini.
2. Dr. Mulya Hadi Santosa Apt., selaku dosen pembimbing pendamping yang dengan sungguh-sungguh memberikan semangat, pengarahan dan motivasi dalam penyelesaian penelitian dan penyusunan tesis ini.
3. Kepada Rektor Universitas Airlangga, Prof. H. Soedarto, dr., DTM &H, Ph.D., mengucapkan atas ijin yang diberikan kepada saya untuk dapat melanjutkan pendidikan pada program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.

## RINGKASAN

Perkembangan metode kontrasepsi pria jauh tertinggal daripada wanita, hal ini disebabkan proses pengendalian spermatogenesis lebih sulit dibandingkan mengendalikan proses ovulasi. Dalam rangka pengembangan kontrasepsi pria, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan hesperitin diduga mempunyai efek menghambat pengeluaran enzim hialuronidase.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian hesperitin secara *in vivo* dan *in vitro* terhadap fungsi penetrasi spermatozoa dan sebagai penghambat aktivitas hialuronidase.

Mencit jantan yang digunakan sebagai sampel penelitian dari strain Balb C sebanyak 100 ekor yang dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Penelitian ini merupakan penelitian laboratorik yang terdiri atas 3 macam eksperimen yaitu eksperimen I, hesperitin diberikan secara *in vivo* setiap hari 1 kali selama 52 hari dengan dosis 0 mg/kg.BB, 31 mg/kg.BB, 41.4 mg/kg.BB dan 82.5 mg/kg.BB. Pada hari ke 52 dilakukan pengambilan spermatozoa dari bagian kauda epididimis, pengujian secara *in vitro*. Eksperimen II, hesperitin ditambahkan pada media M16 dengan dosis 0 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm pengujiannya secara *in vitro*. Eksperimen III, hesperitin diberikan pada media M16 ditambahkan enzim hialuronidase (1500 mikroliter) dengan dosis 0 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm pengujiannya secara *in vitro*.

## ABSTRACT

Nowadays the development of man contraception method is far away behind the woman contraception because of difficulties in controlling spermatogenesis if compared with controlling ovulation process. In order to develop it and based on a research that has been done hesperitin has the inhibitor effect of hyaluronidase enzym.

This research is meant to detect the influence of hesperitin application both by *in vivo* and *in vitro* on spermatozoa penetration function and as an inhibitor of hyaluronidase enzym.

The research uses 100 male mice from the Balb C strain as samples. They are divided randomly into 4 groups. This research consists of 3 experiment; firstly hesperitin is given daily by *in vivo* during 52 days. Secondly hesperitin is added in M16 media and given by *in vitro*. Thirdly hesperitin is added with M16 media and hyaluronidase and given by *in vitro*. Then the observation takes 5 hours which include granulose cell amount and fertilization. The data is tested based on analysis of variant and analysis of chi-quadrant, when the result is meaningful it is continued with Fisher Test.

Result of the research shows that application of hesperitin by *in vivo* does not show meaningful difference, but hesperitin application by *in vitro* shows meaningful difference. Meanwhile hesperitin application added with hyaluronidase enzym by *in vitro* also shows meaningful difference.

**Key words:** Hesperitin, fertilization, antifertility.

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI.....	i
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR SINGKATAN.....	viii
DAFTAR ISTILAH.....	ix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1    Latar Belakang Masalah.....	1
1.2    Rumusan Masalah.....	2
1.3    Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1    Tujuan Umum.....	3
1.3.2    Tujuan Khusus.....	3
1.4    Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1    Tinjauan tentang Hesperidin.....	4
2.1.1    Mekanisme Penyerapan Flavanone.....	5
2.1.2    Hesperidin dan Hesperitin sebagai Penghambat Akumulasi Kompleks Makrofak.....	7
2.2    Tinjauan Enzim Hialuronidase.....	8
2.3    Tinjauan tentang Spermatozoa.....	10
2.3.1    Metabolisme Spermatozoa.....	12

4.4	Bahan dan Alat Penelitian.....	36
4.4.1	Bahan Penelitian.....	36
4.4.2	Alat Penelitian.....	36
4.5	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	37
4.6	Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan Data.....	37
4.6.1	Penentuan Dosis Hesperitin.....	37
4.6.2	Pembuatan Larutan Hesperitin.....	38
4.6.3	Tahap-Tahap Persiapan.....	39
4.6.4	Tahap Perlakuan.....	41
4.7	Pengumpulan Data.....	44
4.8	Tehnik Analisis Data.....	46
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN.....		47
5.1	Hasil Penelitian.....	47
5.1.1	Hasil Uji Fertilitas Mencit Jantan.....	47
5.1.2	Hasil Uji Hesperitin pada Eksperimen I.....	47
5.1.3	Hasil Uji Hesperitin pada Eksperimen II.....	52
5.1.4	Hasil Uji Hesperitin pada Eksperimen III.....	54
5.2	Analisis Hasil Penelitian.....	57
5.2.1	Eksperimen I.....	57
5.2.2	Eksperimen II.....	59
5.2.3	Eksperimen III.....	60



BAB 6 PEMBAHASAN.....	63
6.1    Eksperimen I.....	63
6.2    Eksperimen II.....	67
6.3    Eksperiment III.....	69
BAB 7 SIMPULAN DAN SARAN.....	71
7.1    Simpulan.....	71
7.2    Saran.....	71
DAFTAR PUSTAKA.....	72
LAMPIRAAN.....	75

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 : Bahan M16.....	39
Tabel 4.2 : Rancangan Penelitian.....	46
Tabel 5.1 : Pengaruh Pemberian Hesperitin secara <i>In vivo</i> terhadap Jumlah Sel Granulosa.....	48
Tabel 5.2 : Pengaruh Pemberian Hesperitin secara <i>In vivo</i> terhadap Terjadinya Fertilisasi.....	50
Tabel 5.3 : Pengaruh Pemberian Hesperitin secara <i>In vitro</i> terhadap Jumlah Sel Granulosa.....	52
Tabel 5.4 : Pengaruh Pemberian Hesperitin secara <i>In vitro</i> terhadap Terjadinya Fertilisasi.....	54
Tabel 5.5 : Pengaruh Pemberian Hesperitin dan Hialuronidase secara <i>In vitro</i> terhadap Jumlah Sel Granulosa.....	55
Tabel 5.6 : Pengaruh Pemberian Hesperitin terhadap Terjadinya Lisis.....	57
Tabel 5.7 : Rangkuman Analisis Chi-kuadrat untuk Angka Fertilisasi <i>In Vivo</i> .....	58
Tabel 5.8 : Rangkuman Analisis Varian untuk Jumlah Sel Granulosa Secara <i>In Vitro</i> .....	59
Tabel 5.9 : Rangkuman Analisis Chi-kuadrat untuk Angka Fertilisasi <i>In Vitro</i> .....	60

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Struktur Kimia Hesperidin.....	6
Gamabr 2.2 : Struktur Kimia Hesperitin.....	7
Gambar 2.3 : Morfologi Spermatozoa Normal pada Mamalia.....	12
Gambar 2.4 : Struktur Ekor Sperma.....	16
Gambar 2.5 : Lapisan Telur pada Mamalia.....	19
Gambar 3.1 : Kerangka Konseptual.....	29
Gambar 4.1 : Mikroskop Invertet.....	37
Gambar 4.2 : Kantong Oosit.....	44
Gambar 4.3 : Kerangka Operasional Penelitian.....	45
Gambar 5.1 : Grafik Rata-Rata Jumlah Sel Granulosa secara <i>In vivo</i> .....	49
Gambar 5.2 : Sel Telur yang Intak.....	50
Gambar 5.3 : Fertilisasi dan Proses Fertilisasi.....	51
Gambar 5.4 : Grafik Rata-Rata Jumlah Sel Granulosa secara <i>In Vitro</i> .....	53
Gambar 5.5 : Grafik Rata-Rata Jumlah Sel Granulosa setelah Pemberian Hesperitin dan Hialuronidase secara <i>In Vitro</i> .....	56

## DAFTAR SINGKATAN

CPE	:	Coronary Penetrating Enzym
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography
PCI-CAD MS	:	Positive Chemical Ionization Collsionally Activated Dissociation Tandem Mass Spectrometry
ATP	:	Adeno Triphosphate
ZP	:	Zona Pellucida
Gr	:	Granulosa
SpA	:	Spermatozoa
CMC	:	Carboxy Methyl Cellulose
PBS	:	Phosphate Buffer Saline
BSA	:	Bovine Serum Albumin
PMSG	:	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
HCG	:	Chorionic Gonadotropin

## DAFTAR ISTILAH

Vasektomi	:	Proses pengikatan saluran vasdeferent
Ovulasi	:	Pelepasan Sel Telur yang sudah matang dari ovarium
Lisis	:	Sel-sel granulosa yang telah terdispersi
Fertilisasi	:	Pembuahan atau proses bersatunya antara sel telur dan spermatozoa
Intak	:	Utuh
<i>In Vivo</i>	:	Proses yang terjadi di dalam tubuh
<i>In Vitro</i>	:	Proses yang terjadi di luar tubuh
Media M16	:	Media yang digunakan untuk fertilisasi <i>in vitro</i> pada mencit dan tikus

## BAB 1

### PENDAHULUAN



#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Selama ini sebagian aseptor Keluarga Berencana lebih banyak dilakukan pada wanita, sedangkan untuk obat KB pria belum banyak dilakukan. Metode kontrasepsi pria ketinggalan dibandingkan dengan perkembangan kontrasepsi wanita, sebenarnya hal ini disebabkan rumitnya dalam mengendalikan proses spermatogenesis dibandingkan dengan proses ovulasi. Pada spermatogenesis jutaan spermatozoa harus dikendalikan sedangkan pada ovulasi hanya satu atau beberapa ovum.

Pada prinsipnya kontrasepsi pria dapat melalui empat jenis mekanisme antara lain; kondom, vasektomi, hormonal dan mekanisme gangguan fungsi spermatozoa (Mann and Lutwak Mann, 1981). Mekanisme lain dengan bahan hormonal seperti steroid gonad yang sangat potensial sebagai kontrasepsi pria untuk menekan pituitary gonado tropin tetapi diperlukan dosis yang tepat dan adanya efek samping (Smith *et. al.*, 1980; Mann and Lutwak-Mann, 1981).

Pengembangan inhibitor enzim spesifik spermatozoa menyangkut enzim yang diperlukan untuk fertilisasi, komponen yang penting meliputi hialuronidase, enzim penetrasi korona (CPE) dan akrosin. Ketiga enzim tersebut berada pada bagian kepala spermatozoa (akrosom), masing-masing enzim mempunyai peranan penting dalam proses fertilisasi

ternyata spermatozoa dalam menggunakan masing-masing enzim secara berurutan untuk menembus seluruh lapisan yang berbeda dari sel telur.

Penelitian aktivitas model antifertilitas yang menggunakan hesperidin dengan pertimbangan bahan ini banyak terdapat pada bahan alam, terutama pada buah jeruk (Robinson, 1995). Apabila hesperidin dihidrolisa menghasilkan hesperitin (metil erioditol), ramnosa dan glukosa (Trease dan Evans, 1985). Hal ini sesuai dengan proses metabolisme dalam tubuh, jadi pemberian hesperidin dalam tubuh akan terhidrolisa menjadi bentuk aglikon (hesperitin). Diharapkan yang mempunyai aktivitas inhibitor hialuronidase adalah bentuk aglikon dari hesperidin yaitu hesperitin, sehingga dalam penelitian ini digunakan hesperitin. Untuk memperoleh informasi tentang khasiat antifertilitas dari hesperitin, maka pada kesempatan ini diteliti mengenai pengaruh hesperitin terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit baik secara *in vivo* maupun *in vitro* serta aktivitas hambatan enzim hialuronidase.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka yang menjadi pokok permasalahan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian hesperitin secara *In vivo* dapat menghambat fungsi penetrasi spermatozoa mencit.
2. Apakah pemberian hesperitin secara *In vitro* dapat menghambat fungsi penetrasi spermatozoa mencit.

3. Apakah pemberian hesperitin dapat menghambat aktivitas hialuronidase.

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui dan mempelajari pengaruh pemberian hesperitin secara *in vivo* dan *in vitro* dapat menghambat fungsi spermatozoa mencit.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian hesperitin secara *in vivo* terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian hesperitin secara *in vitro* terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit.
3. Untuk mengetahui pemberian hesperitin sebagai penghambat aktivitas hialuronidase.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai acuan dalam upaya untuk:

1. Memberikan informasi tentang pengaruh hesperitin terhadap aktivitas hialuronidase secara *in vivo* dan *in vitro*.
2. Diharapkan nantinya dapat diaplikasikan sebagai bahan kontrasepsi pria.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Tentang *Hesperidin*

Flavanon merupakan flavonoid yang jumlahnya paling banyak disebagian besar buah spesies Citrus. Citrus merupakan sumber diet utama naringin dan hesperidin dari flavanone, naringin dalam buah anggur dan hesperidin dalam buah jeruk yang menjadi flavanone primer dalam buah Citrus.

Ada hal baru yang menarik dalam farmakologi flavonoid Citrus, terutama yang terkandung dalam buah anggur (Baley *et al.*, 1994). Dalam tubuh, moiety ramnoglukosa 7 dihidrolisir menghasilkan aglikon naringenin dan hesperitin. Senyawa ini menimbulkan banyak efek fisiologis tetapi perannya dalam gizi manusia belum terdefinisikan. Efeknya pada metabolisme senobiotik cukup mengagumkan (Baley *et al.*, 1994)

Diperlukan metode analisa yang sensitif dan spesifik untuk menentukan keberadaan naringenin dan hesperitin dalam tubuh setelah pencernaan Citrus diet. Pada penelitian ini dievaluasi potensi analitik dari berbagai mode Mass Spectrometry untuk mendeteksi kadar renik (trace level) flavanone, naringenin, hesperitin Citrus, termasuk identifikasinya dalam urin manusia setelah pencernaan oral flavanone ini.

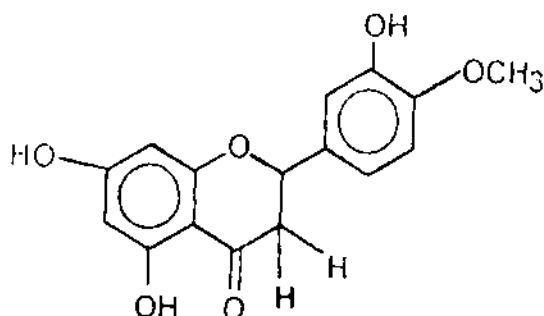
### 2.1.1. Mekanisme Penyerapan Flavanon

Pada analisa flavanone, High Performance Liquid Chromatopgraphi (HPLC) digunakan untuk mengukur naringenin flavanone Citrus, hesperitin dan hesperidin serta mengukur beberapa flavanon dalam jus. Dalam uji tersebut hesperitin diperoleh dari Sigma Chemical Co. Sedangkan hesperidin diperoleh dari Lake Alfred Agricultural Research Center.

Bukti penyerapan oral dari jus buah anggur, aglikon hesperitin dideteksi dengan Positive Chemical Ionization – collisionally Activated Dissociation Tandem Mass Spectrometry (PCI-CAD MS/MS) dalam urin atau plasma atau keduanya. Selain itu dideteksi dengan HPLC/UV dalam eritrosit dari sample darah yang diperoleh setelah pemberian hesperitin. Spektrum massa PCI-CAD sample ini menunjukkan keberadaan hesperitin pada sel-sel darah merah. (Ameer *et al.*, 1996).

Aglikon flavanone dihitung dalam urin dengan HPLC/UV setelah pemberian jus. Bentuk flavanone Citrus tidak langsung diketahui dengan pasti tetapi diduga berupa aglycone glucuronide. Hasil spectrum massa baik dari jus maupun sample urin menunjukkan struktur methoxyflavanone (Ameer *et. al.*, 1996)

Laporan penelitian memberikan bukti bahwa heperitin dan hesperidin glikosida flavanone Citrus diserap dari saluran gastrointestinal manusia setelah pemberian oral. Hal ini merupakan laporan pertama yang mendokumentasikan penyerapan oral hesperidin dan hesperitin flavanone Citrus pada manusia. (Ameer *et. al.*, 1996)



Gambar 2.2: Struktur kimia hesperitin.

### 2.1.2. Hesperidin dan hesperitin sebagai penghambat akumulasi kompleks makrofak.

Ada pernyataan bahwa penggunaan hesperidin dan hesperitin sebagai penghambat akumulasi kompleks makrofag lipid pada endotel arteri pada mamalia. Formula makanan dan minuman seperti roti, kue, jus buah, teh yang mengandung hesperidin dan hesperitin dinyatakan berguna untuk merawat penyakit liver termasuk hepatoserosis, kanker liver dan kerusakan fungsi liver sebagai akibat dari infeksi hepatitis B atau C. Dinyatakan juga kalau hesperidin dan hesperitin berguna untuk mencegah dan mengobati cerebral anemia dan retinal hemorrhage (Lee *et. al.*, 1998).

## 2.2 Tinjauan Enzim Hialuronidase

Hialuronidase pertama diisolasi dari mikroorganisme, testes mamalia, hialuronidase dari testis ini sekarang merupakan sumber utama. Untuk enzim bakteri bukan merupakan hidrolase tetapi bekerja sebagai eliminase, sedangkan hialuronidase dari testis meskipun merupakan hidrolase juga mempunyai aktivitas transglikosilase. Enzim-enzim yang mempunyai ciri-ciri serupa dengan hialuronidase testis telah diperoleh dari cebong, bisa ular, bisa tawon, berbagai jaringan hewan, serum manusia dan lain-lain.

Aktivasi nyata enzim disebabkan oleh pencegahan atau pembalikan penghambat atau oleh perlindungan enzim terhadap denaturasi. Peranan hialuronidase, beta-glucuronidase dan beta-N-acetyl glucosaminidase dalam penetrasi oleh spermatozoa tikus melalui lapisan lapisan yang mengelilingi oosit diteliti dengan tehnik invitro. Myocrisin, fenoprofen, phosphorulated hesperidin dan PS 53 (hidroquinone sulfonic acid formal dehyde polymer) menghambat fertilisasi bila dinkubasi dengan spermatozoa yang dikapasitasi sebelum dicampur dengan oosit utuh, tetapi tidak menghambat jika spermatozoa yang dikapasitasi ditambahkan pada oosit yang bebas dari sel sel folikel. Aktifitas antifertilitas tidak tampak karena adanya efek pada motilitas spermatozoa atau pada oosit. Keempat senyawa ini dikenal sebagai penghambat hialuronidase, dari enzim-enzim akrosomal yang diuji hanya memiliki penghambat hialuronidase. (Joyce *et. al.*, 1986)

Terdapat hubungan linier yang signifikan antara kapasitas atau kemampuan flavonoid untuk menghambat aktivitas hialuronidase spermatozoa tikus dan efek penghambatannya terhadap penetrasi kumulus hamster. Tannic acid diamati mereduksi motilitas spermatozoa dan tidak digunakan dalam uji penetrasi kumulus. Tiga flavonoid lainnya yang diteliti dalam uji penetrasi kumulus tidak mempengaruhi motilitas spermatozoa juga tidak menginduksi reaksi akrosom. Hasil ini menyatakan bahwa flavonoid merupakan alat yang berguna untuk menguji keterlibatan hialuronidase dalam fungsi penetrasi spermatozoa ke dalam proses fertilisasi (Li *et. al.*, 1997).

*Hialuronidase* berfungsi untuk penetrasi *kumulus ooforus*, CPE untuk penetrasi *korona radiata* dan *akrosin (protease)* untuk penetrasi pada daerah *zona pellusida*. Cara kerja *enzim* tersebut sifatnya individual, spesifik dan harus berurutan. Apabila *enzim hialuronidase* telah bekerja menghidrolisa *kumulus ooforus* maka *enzim* berikutnya akan disekresi untuk lapisan berikutnya dari sel telur. Sebaliknya bila daya kerja *enzim hialuronidase* dihambat, tentunya tidak dapat menghidrolisa *kumulus ooforus*, yang pada akhirnya tidak terjadi penetrasi pada lapisan pertama dari *ovum*, tentunya tidak ada *sekresi enzim* berikutnya sehingga tidak terjadi fertilisasi (Patanelli, 1980)

### 2.3 Tinjauan tentang *Spermatozoa*

Spermatozoa adalah sel yang sudah sangat terspesialisasi dan padat yang mana tidak lagi mengalami pertumbuhan (Hafez, 1980). Morfologi spermatozoa merupakan salah satu sifat yang penting untuk mengevaluasi fertilitas pria. Pria dengan spermatozoa yang mempunyai kepala bulat kecil tanpa akrosom adalah steril, sebab ini tidak dapat melakukan fertilisasi dengan oosit baik secara *invivo* maupun *invitro* (Liu, 1992). Persentase spermatozoa dengan morfologi normal memainkan peranan yang penting dalam fertilisasi *invitro*.

Maschiach et al (1992) menyatakan bahwa ultra struktur morfologi dari komponen komponen kepala spermatozoa merupakan kunci parameter untuk membantu kemampuan fertilisasi spermatozoa secara *in vitro*.

Secara morfologi spermatozoa dibagi menjadi tiga bagian yaitu; kepala, mid piece dan ekor (Tournaye, 1994).

Morfologi spermatozoa yang normal menurut WHO (1992) adalah kepala lonjong dengan batas teratur dan tepi akrosom yang menutup lebih dari 1/3 permukaan kepala. Panjang kepala 3–5 mikro m serta lebar berkisar antara 2 dan 3 mikro m, ukuran lebar harus antara  $\frac{1}{2}$  da  $\frac{2}{3}$  ukuran panjang.

Bagian tengah ramping berukuran kurang dari 1/3 lebar kepala, lurus dan batasnya teratur. Bagian tengah terletak pada satu sumbu dengan poros panjang kepala dan berukuran kira kira 7-8 mikro m. Ekor

berbentuk ramping, tidak tergulung dan batasnya teratur. Panjang ekor sedikitnya 45 mikro m.

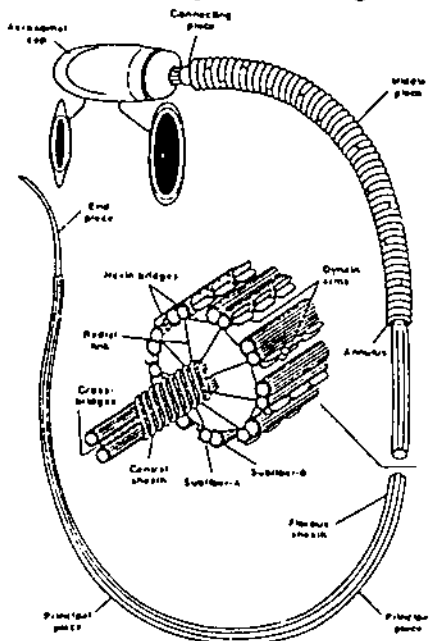
Kepala spermatozoa yang berbentuk lonjong (bulat telur) terutama dibentuk oleh nucleus. Pada bagian anterior kepala spermatozoa terdapat akrosom yaitu merupakan suatu struktur/masa yang berbentuk topi yang menutupi dua pertiga bagian anterior kepala spermatozoa.

Akrosom mengandung beberapa enzim hidrolitik antara lain; hialuronidase, akrosin, coronary penetrating enzym (CPE), yang semuanya penting untuk penembusan telur pada proses fertilisasi (Hafez, 1980; Pederson dan Fawcet, 1976). Bahan kandungan dari akrosom adalah setengah padat yang dikelilingi oleh membran akrosom. Membran akrosom terdiri dari dua lapis yaitu membran akrosom dalam dan membran akrosom luar. Secara molekuler susunan kedua membran akrosom ini sangat berbeda, membran akrosom luar bersatu dengan plasma membran (membran spermatozoa) pada waktu terjadinya reaksi akrosom, sedang membran akrosom I dalam menghilang (Nagae *et. al.*, 1986)

Mid piece spermatozoa mempunyai panjang kurang lebih 5-7 mikro m dipisahkan dari tail piece oleh cincin yang disebut annulus, memiliki sebagian sitoplasma yang kaya lipid, berisi beberapa spiral mitochondria dan dikelilingi oleh suatu filamen yang berbentuk helix. Mid piece spermatozoa berhubungan dengan kebutuhan energi untuk motilitas spermatozoa dan juga berperan pada metabolisme oksidatif spermatozoa (Peterson dan Freund, 1976). Beberapa zat-zat yang terdapat pada mid

piece yang berhubungan dengan fungsinya antara lain; enzim glikolitik, asam amino sulfhidril, kolesterol, Cu, Ca, K, Fe, Sitokrom oksida, lipid dan Fosfat (Hafez, 1980)

Ekor spermatozoa terbentuk dari axonemes yang merupakan poros dari ekor spermatozoa yang terdiri dari mikrotubulus dan serabut serabut memanjang yang saling berhubungan.



Gambar 2.3: Morfologi spermatozoa normal pada mamalia

Sumber: Tournaye, 1994.

### 2.3.1. Metabolisme Spermatozoa.

Metabolisme didalam spermatozoa bertujuan untuk pembentukan Adeno Triphosphat (ATP). ATP ini dipergunakan untuk menyokong mekanisme pergerakan spermatozoa dan mempertahankan keseimbangan osmose (Hafez, 1980). Oleh karena itu kecepatan metabolisme spermatozoa berhubungan secara langsung dengan



motilitas. Tempat terjadinya metabolisme ialah di sitoplasma dan mitochondria mid piece.

Spermatozoa manusia, glikolisis merupakan cara terbesar untuk membentuk energi dan motilitas sel dapat dipertahankan dengan memanfaatkan energi yang didapat dari metabolisme pernafasan (Hafez, 1980).

ATP yang dibentuk dengan cara glikolisis atau fruktolisis tersebut dapat dengan cara anaerobic dan aerobik yaitu melalui siklus krebs (siklus asam sitrat). Metabolisme aerobik melibatkan pengambilan oksigen ( $O_2$ ) yaitu dengan cara respirasi dan aktifitas dari system sitokrom oksidase yang berhubungan dengan membran mitokondria. Konsumsi oksigen pada spermatozoa manusia umumnya rendah.

Substrat atau bahan bakar pada umumnya berasal dari bahan bahan yang ada pada plasma semen (eksogen) antara lain; glukosa, fruktosa, manosa, galaktosa, piruvat, sorbitol, asam oksalat, asam suksinat dan asam lemak jenuh (Zaneveld, 1985) dan dapat juga substrat berasal dari dalam spermatozoa sendiri (endogen) antara lain; fosfolipid terutama pada keadaan mendesak. Bahan bakar eksogen glukosa dan piruvat lebih siap dimetabolisme dibandingkan eksogen lain. Kecepatan metabolisme spermatozoa sangat tergantung pada tingginya jumlah nukleotida (ATP, AMP, ADP) dan lebih tinggi bila didukung oleh faktor factor seperti: mudahnya substrat digunakan, konsentrasi enzim dan transport ion-ion pada membran (Zaneveld, 1985).

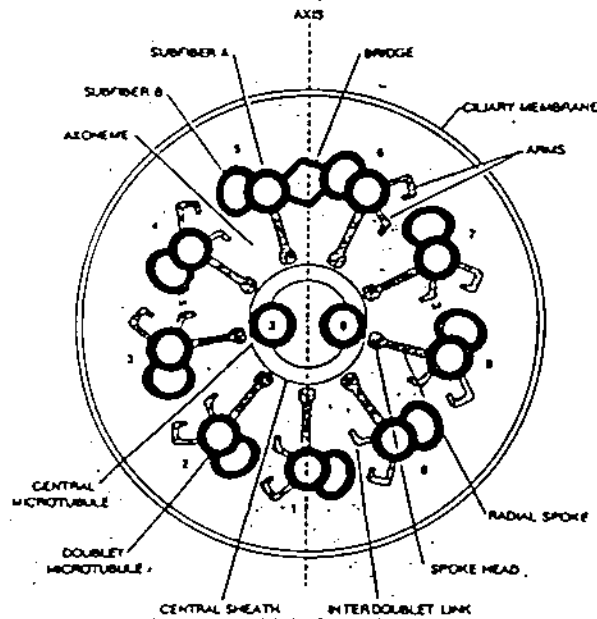
Mekanisme metabolisme spermatozoa adalah sebagai berikut glukosa secara difusi masuk melalui membran mid piece kemudian dalam sitoplasma mid piece mengalami glikolisis dan sebagai hasilnya adalah asam piruvat, asam laktat dan ATP. Selanjutnya asam piruvat dengan bantuan piruvat dehidrogenase diubah menjadi asetil Ko-A, selanjutnya masuk dalam siklus krebs dengan bantuan oksigen, rantai respirasi dan sistem sitokrom akan terbentuk ATP, yang selanjutnya diserahkan pada auter dens biber untuk menimbulkan pergerakan kontraktile (Mitchel *et. al.*, 1976)

### 2.3.2. Motilitas Spermatozoa.

Motilitas spermatozoa merupakan parameter penting untuk menilai kemampuan fertilitas, pria dengan spermatozoa imotil adalah steril. Spermatozoa imotil, apakah hidup atau mati, tidak dapat menembus cervical mucus. Selanjutnya tipe gerakan juga berpengaruh terhadap kemampuan fertilisasi, spermatozoa yang berenang dengan gerakan melingkar tidak dapat menembus uterotubal junction dan hanya spermatozoa yang berenang dengan gerak lurus yang berhasil memfertilisasi ovum. Pukulan ekor spermatozoa yang hebat diperlukan untuk penembusan kepala spermatozoa menembus corona radiata untuk memfertilisasi ovum (Amelar, 1980). Untuk bisa mengetahui bagaimana mekanisme gerak ekor spermatozoa sehingga mampu mendorong kepala spermatozoa maju ke depan, maka dibutuhkan pengetahuan gambaran mikro struktur ekor spermatozoa.

Ekor spermatozoa terbentuk dari suatu axonemas yang merupakan unsur utama dari suatu pergerakan. Axonema merupakan poros dari ekor spermatozoa yang terdiri dari mikrotubulus dan serabut serabut memanjang yang saling berhubungan. Axonemas tersusun dari mikrotubulus dengan pola dasar mikrotubulus 9+2, dimana 2 mikrotubulus berada ditengah yang disebut sentral mikrotubulus dan dikelilingi 9 doublet mikrotubulus yang terdiri dari 2 sub fiber A dan sub fiber B.

Su fiber A merupakan suatu mikrotubulus yang lengkap dengan 13 protofilamen. Su fiber B lebih pendek terdiri 10 dan 11 protofilamen. Molekul dynein terletak di sepanjang sub fiber A membentuk 2 perangkat lengan yaitu inner dynein arm dan auter dynein arm yang mengarah ke sub fiber B. Terdapat radial spoke antara doublet mikrotubulus dan selubung sentral menyebabkan ekor spermatozoa membelok, melurus menyamping dan menimbulkan gerakan gelombang menyebar ke ujung distal sehingga menghasilkan momentum gerakan yang bisa mendorong kepala maju ke depan (Amelar, 1980). Mekanisme dari gerakan ekor spermatozoa tersebut disebut *Sliding Microtubule hypotesis* yang pertama kali diperkenalkan oleh Afzelius. Adapun struktur ekor spermatozoa dengan pola dasar axonemas 9+2 adalah sebagai berikut:



Gambar 2.4: Struktur ekor spermatozoa dengan pola dasar axonemas

9+2 Sumber: Amelar, R.D, *et. al.*, 1980.

Faktor utama yang mengontrol motilitas spermatozoa adalah ATP yang dihasilkan oleh mitokondria dan ditransport ke axonemas (Tournaye, 1994) ATP tersebut melalui proses hidrolisis enzimatik diubah menjadi Adenosine Diphospat dan Asam Pospat. Enzim pemecah ATP ini dinamakan dynein. Dynein ini dihambat oleh Cadmium, Zinc, Mercury dan grup sulfhydryl (Amelar, 1980). Konsentrasi ATP menentukan frekuensi gerakan ekor. Lingkungan di sekitar axonemas berisi ion-ion (Mg, Ca, Zn) mempengaruhi besar dan arah gerak sliding mikrotubulus dan dapat menentukan bentuk gelombang, arah gerak yang efektif dan arah dorongan lengkung yang terjadi sepanjang axonemas (Amelar, 1980). Ion Calcium dan ion Magnesium menjadi perantara aktivitas enzim yang berperan dalam proses kontraksi dan relaksasi ekor spermatozoa. Ion Kalsium bekerja pada tingkat transport membran dengan mempengaruhi

permeabilitas seluler. Ion Magnesium bekerja pada tingkat hidrolisis Adenosin Tri pospat (Mitchel, 1976).

Dengan demikian pola gerak flagel (ekor) spermatozoa dikontrol oleh faktor-faktor aktivitas metabolic intraseluler, integritas membran sperma, efek biomolekul pada elemen-elemen flagel dan faktor-faktor eksternal seperti terdapatnya substrat, ion-ion dan sifat fisik dari lingkungan mikro spermatozoa (Tournaye, 1994).

### 2.3.3. Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Motilitas Spermatozoa

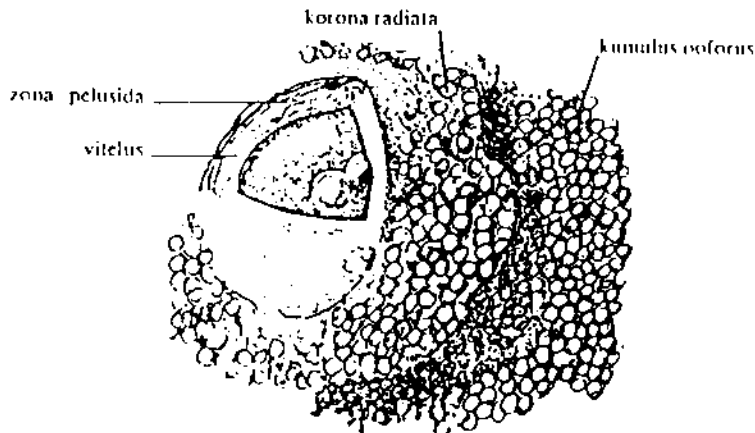
Faktor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa yaitu faktor endogen dan faktor eksogen (Mitchel *et. al.*, 1976). Faktor endogen antara lain: penyimpanan dalam epididimis, waktu antara ejakulasi dan pemeriksaan, maturasi spermatozoa (morfologi, fisiologi dan biokemis) simpanan energi (ATP) yaitu transport membran spermatozoa, transport ion (Battersby dan Chandler, 1977), factor aglutinasi, reseptor permukaan spermatozoa , integritas membran sperma (Hafez,1980).

Faktor eksogen yang mempengaruhi motilitas spermatozoa adalah faktor biofisik dan fisiologi yaitu hidrodinamik, viskositas dan osmolaritas. Faktor biofisik dan fisiologi yang berpengaruh adalah tekanan osmotik pH, temperatur dan komposisi ion (Battersby dan Chandler, 1977), cairan yang dihasilkan oleh traktus reproduksi pria dan wanita (cairan epididimis, seminal plasma, lendir servix, cairan uterin, cairan oviduct, bahan perangsang dan penghambat antara lain: anorganik ion (Cu, Zn, Cd, Mn, Hg), produk ekskretori, neurofarmakologi, hormon, cyclic nukleotid, kinin,

prostaglandin pencemaran lingkungan spermatozoa dan factor imunokemis (Hafez, 1980). Prostaglandin mempunyai pengaruh terhadap kecepatan pergerakan spermatozoa, karena asam lemak bebas ini merupakan molekul lipid yang sangat toksik (Siegel *et. al.*, 1986).

## 2.4 Tinjauan tentang *Ovum*

Permukaan *ovum* pada umumnya dilapisi oleh lapisan non seluler yang merupakan penghalang (*barier*), misal mantel lendir (*jeli*), *membran vitelina* dan sering juga didapatkan *barier* tambahan tersusun oleh sel seperti sel *folikel* yang membungkus *ovum mamalia*. Pada waktu siap difertilisasi *ovum* manusia diselimuti oleh tiga lapisan dari luar ke dalam yang meliputi; *kumulus ooforus*, *korona radiata* dan *zona pelusida*. Dua lapisan pertama terdiri dari sel-sel yang terdapat dalam matriks *glikoprotein*, sedangkan lapisan ketiga merupakan lapisan non seluler dan terdiri dari *mukopolisakarida* dan *mukoprotein*, *ovumnya* sendiri dilapisi oleh *membran vitelina*. Antara *membran vitelina* dan *zona pelusida* terdapat ruangan yang dinamakan ruangan *perivetelin*. Susunan *ovum* dan lapisan yang menyelimuti dapat dilihat pada gambar sebagai berikut (Polakoski dan Zaneveld, 1976).



Gambar 2.5: Lapisan telur pada mamalia

#### 2.4.1. Pembentukan Oosit (Oogenesis)

Pada tahap hidup embrionik, oogonia (sel-sel primordial tempat munculnya oosit) bertambah dengan cepat melalui pembelahan mitosis dan mulai mengalami meiosis. Pada tujuh bulan gestasi semua oogonia telah berubah menjadi oosit. Akan tetapi, meiosis tidak berlangsung lebih lanjut dibanding tahap pertama, profase, pembelahan meiosis pertama, fase dimana kromosom kembar berpasangan. Sel-sel yang disebut oosit primer tetap pada tahap ini, yang berlangsung selama 40 tahun. Tepat sebelum ovulasi, meiosis dimulai lagi sebagai akibat dari kenaikan level Luteinizing Hormone (LH). Dimulainya kembali meiosis ini, bersamaan dengan beberapa proses-proses yang lain dimulai terjadi di oosit, dinamakan maturasi atau pematangan (Polakoski dan Zaneveld ., 1976).

#### 2.4.2. Struktur Oosit

Oosit berupa sel bulat besar dan relatif banyak nukleus, nucleus ini disebut germinal vesicle. Oosit dikelilingi oleh zona pellucida (zp), lapisan transparan. Zona ini dikelilingi oleh sel sel granulose (Gr). Cabang dari sel-sel granulose menembus oosit. Cabang-cabang ini mungkin bertindak mengirimkan sinyal sinyal dan nutrien. Oosit sendiri dikelilingi oleh membran plasma dengan banyak ekstensi atau perpanjangan, yang disebut mikrovilli (M). Dibawah membran sel terletak granula korteks (C), sejumlah granula bulat. (Polakosko dan Zaneveld, 1976).

#### 2.4.3. Maturasi

Selama proses maturasi sel granulose dalam keadaan matang, disintesa asam hialuronat sehingga diantara sel granulose keluar cabang cabang yang disebut expended. Oleh karena itu oosit dapat berkembang lebih lanjut. Permulaan maturasi dapat dilihat karena ketidak nampakkan germinal vesicle. Selama maturasi pasangan pasangan kromosom yang homolog memisah, yang menghasilkan dua sel baru. Sel-sel baru ini sangat berbeda ukurannya. Sel terkecil yang disebut polar body pertama, hanya mengandung sedikit materi selular. Sel yang terbesar, oosit sekunder, tidak berkembang lebih lanjut kecuali jika fertilisasi berlangsung. (Polakoski dan Zeneveld, 1976).



## 2.5 Tinjauan Fertilisasi

Fertilisasi atau pembuahan adalah peristiwa bersatunya antara spermatozoa dengan sel telur, pembuahan sering diartikan sebagai penyerbukan. Sel spermatozoa atau sel telur berasal dari dua sel yang berbeda, maka untuk dapat bertemu dan bersatu kedua unsur tersebut harus melalui perjalanan panjang dan mengalami proses persiapan serta tempat pertemuan harus memenuhi syarat bagi sel spermatozoa dan sel telur (Partodihardjo, 1982). Menurut Toelihere (1980) pembuahan terjadi dari penyatuan dua buah sel gamet jantan dan betina untuk membentuk zigot. Pembuahan merupakan dua proses ganda. Dalam aspek embriologi pembuahan meliputi pengaktifan sel telur oleh spermatozoa. Tanpa rangsangan sperma sel telur tidak akan mengalami pembelahan (cleavage) dan tidak ada perkembangan embrio. Kemudian dalam aspek genetik pembuahan meliputi pemasukan faktor factor hereditas pejantan ke dalam sel telur. Disinilah terdapat manfaat perkawinan atau inseminasi yaitu untuk menyatukan faktor-faktor unggul ke dalam satu individu. Pada hampir semua mamalia, pembuahan dimulai ketika badan kutub pertama disingkirkan, sehingga sperma menembus dan masuk ke dalam sel telur sewaktu pembelahan reduksi kedua berlangsung.

Pembuahan terdiri dari serangkaian langkah yang dimulai dengan penembusan lapisan sel telur, dilanjutkan masuknya sel spermatozoa ke dalam sitoplasma pengikat dan pengaktif sel telur. Penggabungan dari sel telur dan sel spermatozoa yang tidak sejenis akan mengawali proses perkembangan embrio. Pengaktifan dari sel spermatozoa dan sel telur

akan merangsang terjadinya proses pembuahan, namun yang perlu diperhatikan adanya aspek yang sangat berbeda pada pembuahan yaitu pengaruh paternal kromosom pada sel telur, sehingga jarang penelitian dititik beratkan pada aspek aktivasi dari fertilisasi dibandingkan dengan faktor genetik.

Daya hidup dari sel telur dan sel spermatozoa sangat terbatas, lama hidup dan kemampuan untuk pembuahan dari sel telur dan sel spermatozoa sangat terbatas pada beberapa spesies berbeda. Periode lamanya waktu untuk membuahi dari sel telur oleh sel spermatozoa setelah proses ovulasi pada mamalia sulit untuk ditetapkan, tetapi umumnya sel mamalia dapat dibuahi kurang lebih 12 jam sesudah terjadi proses ovulasi.

Jalur yang ditempuh oleh sel telur ke tempat pembuahan berbeda dengan jalur jelajah oleh sel spermatozoa, karena pada kelamin betina antara ovarium dengan saluran kelamin tidak ada hubungannya yang menerus. Sel telur yang baru diovulasikan harus melintasi rongga perut sebelum masuk ke gerbang saluran kelamin. Perpindahan ini disebut lintas luar (*eksternal migration*). Sel telur seharusnya masuk ke dalam saluran kelamin, tetapi ada kalanya gagal, umpamanya lintasan tersebut dipengaruhi oleh bentuk anatomi, keadaan faal dan factor endokrin. Sel telur yang diovulasikan dari ovarium kiri, ada kalanya masuk ke dalam gerbang saluran kelamin kanan, keadaan ini disebut lintas *transperitonal*. Kejadian ini dapat diketahui dengan jalan melakukan percobaan.

Pada keadaan normal sel telur masuk ke dalam tuba falopii melalui gerbang tuba luar (ditangkap fimbriae). Selanjutnya dari sel telur tersebut ada dua kemungkinan yaitu dibuahi atau tidak dibuahi.

## 2.6 Perjalanan Obat-obatan dan Zat-zat lain dalam Semen

Alkohol sama sekali tidak aneh atas kemampuannya melewati sekresi aksesoris pria setelah dicerna. Beberapa obat melakukan hal yang sama, pada umumnya dapat ditegaskan bahwa jaringan-jaringan saluran reproduksi pria maupun wanita tidak menimbulkan penghambat atau penghalang yang efektif pada zat-zat asing (Collier dan Flower, 1971; Jubiz dan Frailey, 1973; Vane, 1971).

Obat-obatan yang umum digunakan seperti salicylates dan sulphonamides, masuk dengan cepat ke dalam semen manusia atau binatang dan seperti alkohol tampak bersifat nontoksik pada spermatozoa invitro (Eliass dan Dornbusch, 1977). Namun dalam studi-studi jenis ini, hasil positif yang salah dihasilkan oleh kontaminasi ejakulat dengan bekas urin tidak boleh diabaikan, jika obat hanya diketemukan pada fraksi pertama ejakulat yang pecah, hal ini memberikan isyarat bahwa ini berasal dari urine yang ada dalam uretra (Paz dkk, 1979).

Survei singkat ini menunjukkan bahwa penelitian tentang jalannya atau masuknya obat-obatan dan zat-zat lain ke dalam semen sangat menguntungkan baik secara ilmiah atau klinis dalam hubungannya dengan permasalahan peningkatan dan pengurangan fertilitas pria (Smith dkk, 1997)



## 2.7 Pemilihan Konsentrasi Obat

Pada pemilihan konsentrasi obat sebaiknya ditentukan dengan memperhatikan tingkat terapeutik yang dapat dicapai dengan dosis obat yang digunakan secara klinis. Bila aktivitas potensial suatu senyawa disaring pra klinis (sebelum digunakan secara klinis), maka hal itu tidaklah mungkin untuk bukti yang terkumpul tentang kadar *in vitro* senyawa yang efektif yang sudah diketahui, maka dapat diketahui bahwa batas atas 100 mikro g/ml dianjurkan. (Freshney, 1986)

## 2.8 Pemilihan Hewan Coba

Percobaan pada mamalia umumnya menggunakan hewan laboratorium seperti mencit dan tikus, mengingat beberapa hal, yaitu mencit dan tikus mempunyai siklus reproduksi yang pendek 4 – 5 hari, ukurannya relatif lebih kecil sehingga mudah ditangani, biaya pemeliharaan dan produksi lebih murah dibandingkan hewan percobaan mamalia lainnya.

Umur dewasa kelamin pada mencit bervariasi tergantung strain dan perkembangannya, namun menurut Peter dan Hume (1976), dewasa kelamin pada mencit dicapai pada umur antara 3,5 – 4 minggu. Umur dewasa kelamin mencit adalah 5 – 7 minggu pada betina dan 6 – 7 minggu pada jantan. Umur yang baik untuk betina dikawinkan adalah 6 – 8 minggu.

Mencit termasuk golongan hewan yang memiliki siklus estrus (berahi) tipe poliestrus, yakni hewan yang berahi lebih dari dua kali

setahun, dengan selang siklus berahi 4 – 5 hari. Berdasarkan sifat estrusnya maka tahapan periode berahi pada mencit dapat dikategorikan menjadi empat periode, yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus.

Perkawinan pada mencit dengan cara Monogamous pair mating, trio mating atau Harem mating.

Kebuntingan ditandai oleh periode diestrus yang lama, sekitar 17 – 22 hari atau rata rata 19 – 20 hari. Rata-rata anak yang lahir sekitar 4,5 – 7,4 gram (Bennet dan Vickery dan Hafez, 1970). Anak yang lahir sekitar 9 – 10 ekor. Adapun penyapihan dilakukan pada umur 18 – 21 hari dengan berat badan sekitar 10 - 12 gram.

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual

Kerangka konseptual yang diajukan berdasarkan landasan teoritis dan empiris sebagai berikut.

Pada tahun 1997, dilakukan suatu penelitian model antifertilitas yang menggunakan hesperidin, adapun hasil yang diperoleh pada kelompok perlakuan yaitu tidak terjadi fertilisasi, disamping sel-sel kumulus yang masih utuh. Hal ini membuktikan bahwa hesperidin dapat digunakan sebagai inhibitor enzim hialuronidase yang spesifik, bekerja pada kumulus ooforus (Bambang dkk, 1997)

Hesperidin merupakan senyawa glikosida flavonoid dan merupakan senyawa polifenol termasuk bahan inhibitor enzim hialuronidase. Pada tahun 1948 sampai tahun 1954 banyak laporan tentang aktivitas hesperidin pada pemberian per oral dan intraperitoneal yang dapat mencegah terjadinya fertilisasi baik pada hewan maupun pada manusia (Zaneveld, 1976).

Fungsi penetrasi terdapat mekanisme penembusan dengan melibatkan enzim spesifik dari spermatozoa, sehingga untuk mencegah fertilisasi tentunya dapat dicari bahan bahan penghambat enzim tersebut. Dari berbagai jenis gangguan fungsi penetrasi spermatozoa metode hambatan enzim spermatozoa dalam penetrasi relatif baru dipelajari dan sangat potensial (Patanelli, 1980).

Pengembangan inhibitor enzim spesifik spermatozoa menyangkut enzim yang diperlukan untuk fertilisasi, komponen yang penting meliputi Hialuronidase, Enzim Penetrasi Coronary (CPE) dan Akosin. Ketiga enzim tersebut berada pada bagian kepala spermatozoa (akrosom), masing-masing enzim mempunyai peranan penting dalam proses fertilisasi, masing-masing enzim bekerja secara berurutan untuk menembus seluruh lapisan yang berbeda dari sel telur. Hialuronidase berfungsi untuk penetrasi kumulus ooforus, CPE untuk penetrasi korona radiata dan Akrosin (Protease) untuk penetrasi pada daerah zona pelusida. Cara kerja enzim tersebut sifatnya individual, spesifik dan harus berurutan. Apabila enzim hialuronidase telah bekerja menghidrolisa kumulus ooforus maka enzim berikutnya akan disekresi untuk lapisan berikutnya dari sel telur. Sebaliknya bila daya kerja enzim hialuronidase dihambat tentunya tidak dapat menghidrolisa kumulus ooforus, akhirnya tidak terjadi penetrasi pada lapisan pertama dari ovum, tentunya tidak ada sekresi enzim berikutnya sehingga tidak terjadi fertilisasi (Patanelli, 1980).

Mata rantai glikosida kurang stabil dibandingkan mata rantai glukoronida dan mungkin tidak tahan terhadap lingkungan asam dalam perut. Selain itu glikosida dari bakteri usus dapat membelah residu gula. Flavanone yang dipanen dalam urin dihitung setelah hidrolisis enzimatis sebagai aglikon, fraksi-fraksi yang tidak terhidrolisir tidak mengandung aglikon. Karena itu flavanone urin diduga berasal dari metabolit naringenin dan hesperitin glucuronide. Kemungkinan kecil kalau aglikon

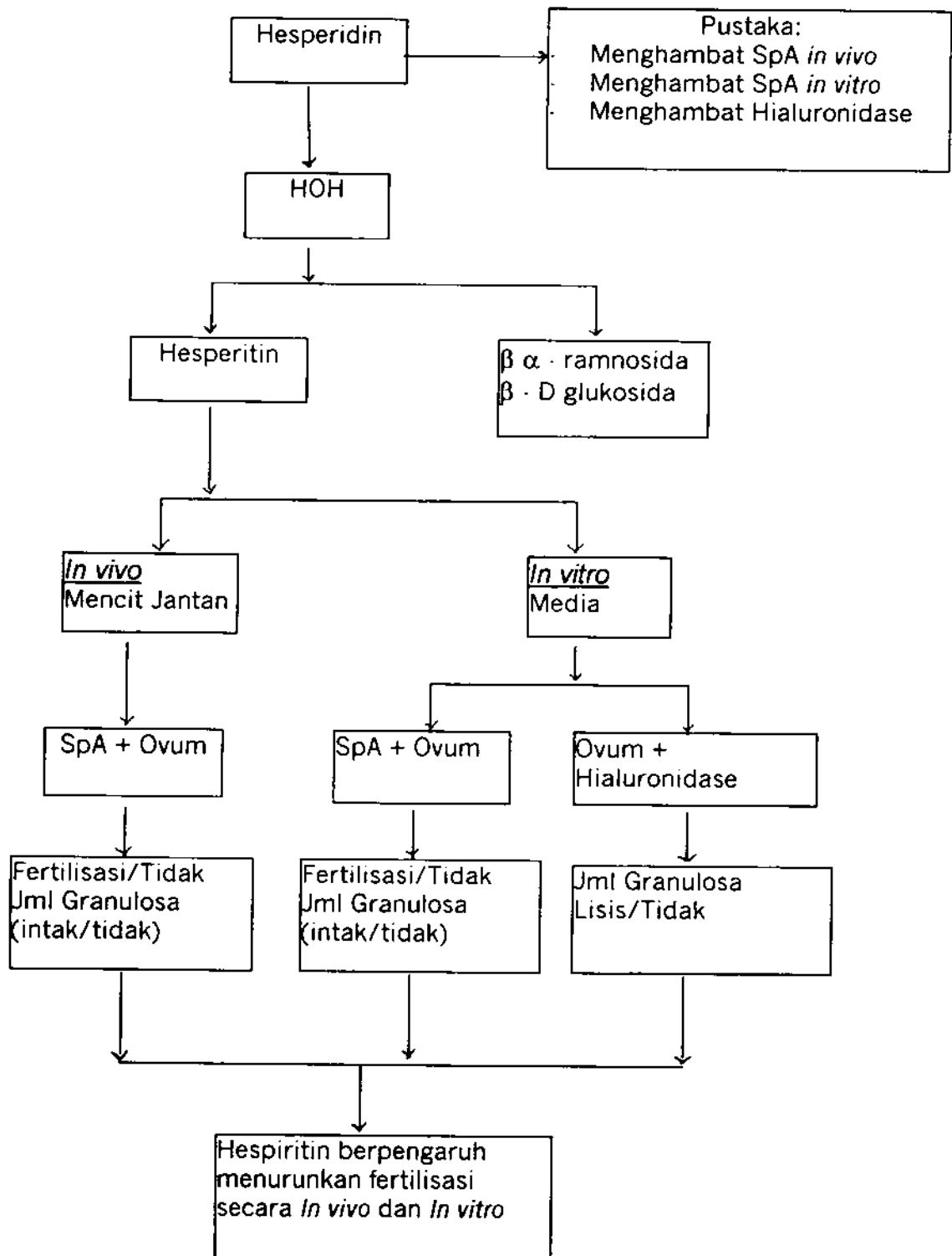
langsung berasal dari naringin dan hesperidin, sebab beta glukoronidase menjadi beta-glukoronida dan beta-glikosida (Ameer *et. al.*, 1996).

Pemilihan konsentrasi obat sebaiknya ditentukan dengan memperhatikan tingkat terapeutik yang dapat dicapai dengan dosis obat yang digunakan secara klinis. Kadar *in vitro* senyawa yang efektif untuk batas atas yang dianjurkan adalah 100 mikrogram/ml. (Freshney, 1986).

Secara umum informasi ilmiah tentang pengaruh hesperitin terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit jantan yang dilakukan baik secara *in vivo* maupun *in vitro* belum banyak dilakukan, oleh karena itu perlu adanya penelitian tentang sejauh mana pengaruh hesperitin terhadap fungsi penetrasi spermatozoa secara *in vivo* maupun *in vitro* serta aktifitas hambatan terhadap enzim hialuronidase.



## KERANGKA KONSEPTUAL



Gambar 3.1: Skema Kerangka Konseptual

### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. *Pemberian hesperitin secara in vivo* dapat menghambat fungsi penetrasi *spermatozoa* mencit .
2. *Pemberian hesperitin secara in vitro* dapat menghambat fungsi penetrasi *spermatozoa* mencit ,
3. *Pemberian hesperitin secara in vitro* dapat menghambat aktivitas *hialuronidase*.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik yang terdiri dari 3 macam eksperimen yaitu:

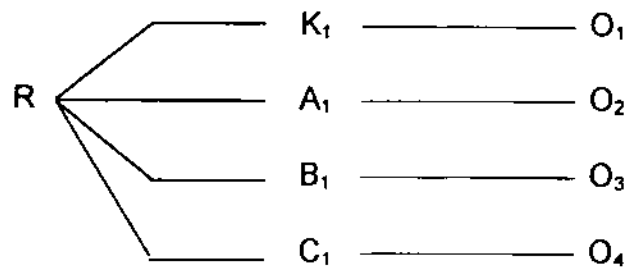
Eksperimen pertama, pemberian hesperitin secara *in vivo* yang diberikan per oral dengan dosis 0, 31, 41,5, 82,5 mg/kg/BB. Diberikan selama 52 hari pada mencit jantan. Tujuan dari eksperimen ini untuk mengetahui apabila dilakukan pengujian secara *in vitro* dapat menurunkan fungsi penetrasi spermatozoa. Yang dimaksud dengan menurunkan fungsi penetrasi spermatozoa dalam penelitian ini adalah tidak terjadi fertilisasi.

Eksperimen kedua pemberian hesperitin secara *in vitro*, hesperitin ditambahkan pada media M16 dengan dosis 0, 50, 75, 100 ppm. Tujuan dari penelitian ini untuk membuktikan kemampuan hesperitin untuk menurunkan atau menghambat fungsi penetrasi spermatozoa.

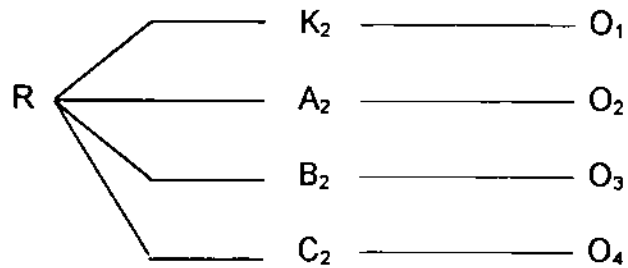
Eksperimen ketiga juga secara *in vitro*, hesperitin ditambahkan pada media M16 dengan dosis 0, 12,5, 25, 50, 75, 100 ppm. Pada eksperimen ketiga ini tidak digunakan spermatozoa tetapi diberikan hialuronidase. Tujuan dari eksperimen ini untuk mengetahui bahwa hesperitin dapat menghambat aktivitas hialuronidase. Adapun rancangan yang digunakan dalam tiga eksperimen tersebut adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 10 kali ulangan.

Diagram rancangan penelitian tersebut adalah sebagai berikut:

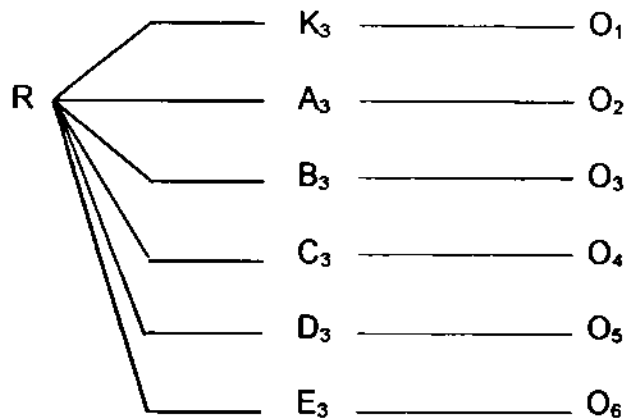
Pada eksperimen I:



Pada eksperimen II:



Pada eksperimen III:



Keterangan :

Eksperimen I, secara *in vivo*:

- K<sub>1</sub> : kelompok kontrol tanpa diberikan larutan hesperitin
- A<sub>1</sub> : diberikan larutan hesperitin 31mg/kg/berat badan
- B<sub>1</sub> : diberikan larutan hesperitin 41,5mg/kg/berat badan
- C<sub>1</sub> : diberikan larutan hesperitin 82,5mg/kg/berat badan

Eksperimen II, secara *in vitro*:

- K<sub>2</sub> : kelompok kontrol, media M16 tanpa diberikan larutan hesperitin
- A<sub>2</sub> : diberikan larutan hesperitin pada media M16 50 ppm
- B<sub>2</sub> : diberikan larutan hesperitin pada media M16 75 ppm
- C<sub>2</sub> : diberikan larutan hesperitin pada media M16 100 ppm

Eksperimen III, secara invitro:

- K<sub>3</sub> : kelompok kontrol, media M16 tanpa diberikan larutan hesperitin
- A<sub>3</sub> : diberikan larutan hesperitin pada media M16 12.5 ppm
- B<sub>3</sub> : diberikan larutan hesperitin pada media M16 25 ppm
- C<sub>3</sub> : diberikan larutan hesperitin pada media M16 50 ppm
- D<sub>3</sub> : diberikan larutan hesperitin pada media M16 75 ppm
- E<sub>3</sub> : diberikan larutan *hesperitin* pada media M16 100 ppm

## 4.2 Populasi dan Sampel

### 4.2.1 Populasi.

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit (*Mus musculus*) baik jantan umur 3 – 4 bulan maupun betina umur 2 bulan dari strain Balb C, yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya.

### 4.2.2. Sampel

Sampel berasal dari populasi yang dipilih dengan persyaratan tertentu yaitu, umur mencit jantan 3 - 4 bulan dengan berat badan 20 – 40g. Untuk mencit betina umur 2 - 3 bulan dengan berat badan 20 - 35g.

Mencit jantan dan betina yang digunakan sebagai sampel dipilih yang sehat masing-masing sebanyak 100 ekor yang diambil secara acak dari mencit jantan dan betina masing-masing sebanyak 125 ekor.

## 4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

### 4.3.1. Variabel Penelitian :

- Variabel bebas:

dosis larutan hesperitin

- Variabel tergantung:

jumlah sel granulose, jumlah sel spermatozoa, terjadinya fertilisasi dengan tolok ukur terbentuknya zigot; terbentuknya pronukleus jantan dan betina; adanya kepala spermatozoa dalam inti granulose.

- Variabel terkendali:

Strain, umur, berat badan, pakan, perawatan

#### 4.3.2. Definisi Operasional Variabel.

a. Hesperitin:

Merupakan aglikon dari hesperidin (bahan anti fertilitas)

b. Penetrasi:

Kemampuan spermatozoa dalam menembus ovum.

c. Fertilisasi *in vitro*:

Proses pembuahan spermatozoa dan ovum diluar tubuh.

d. Pemberian hesperitin *in vivo*:

Pemberian larutan hesperitin pada mencit jantan per oral berdasarkan berat badan mencit.

e. Pemberian Hesperitin *in vitro*:

Pemberian larutan hesperitin pada media berdasarkan dosis ppm.

f. Jumlah sel Spa dan Jumlah sel Granulosa:

Yang dihitung dalam satu lapangan pandang pada mikroskop inverted pada perbesaran 400 kali.

g. Lama pengamatan yang dilakukan: 5 jam.

h. Fertilisasi:

terbentuknya zigot ,terbentuknya pronukleus jantan dan betina, diketemukannya kepala spermatozoa pada inti.

#### 4.4 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.4.1 Bahan Penelitian

Mencit jantan dan betina dari *strain Balb.C.*, mencit tersebut diperoleh dari PUSVETMA Surabaya. *Hesperitin (Sigma)*, *Carboxy Methyl Cellulose (CMC)*, *Phosphat Buffer Saline (PBS) (Sigma)*, *Bovine Serum Albumin (BSA)(Sigma)*, *Mineral Oil(Squibb)*, *Hormon Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) (Intervet)*, *Hormon Chorionic Gonadotropin (HCG) (Intervet)*, *Metanol*, *Medium M16*.

Bahan-bahan untuk pembuatan *Medium M16*; *Na Cl*, *KCL*, *CaCl<sub>2</sub> ZH<sub>2</sub>O*, *KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>*, *1 Mg SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O*, *Na HCO<sub>3</sub>*, *Na laktat*, *Na piruvat*, *glucosa*, *BSA*, *penicilin*, *streptomycin*, *aquabidest*.

Zat warna, *Hematoxyline Eosin 11%*.

##### 4.4.2. Alat-Alat Penelitian

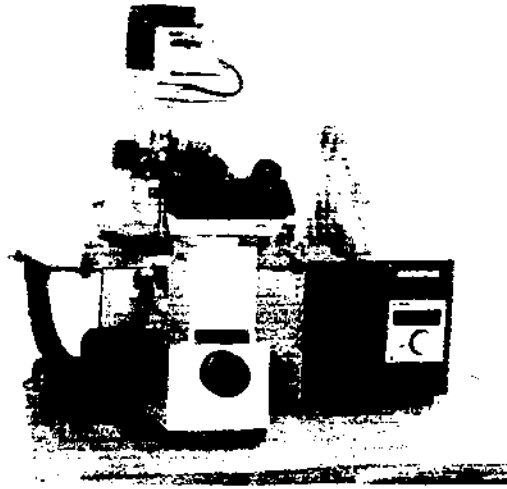
###### a) Peralatan untuk pengamatan:

Inkubator CO<sub>2</sub> 5 %, *Mikroskop Inverted*, *Timbangan elektrik*, *Pipet Socorex*, *peralatan bedah mikro*, *pipet Pasteur*, *sput disposable*. *Sentrifuge*, *cawan Petri*, *Mikroskop Biasa*, *Lampu Spirtus*, *Autoclaf*, *Oven*, *Refrigerator*.

###### b) Alat untuk pemeliharaan hewan coba:

Kandang ukuran 40 x 50 cm, tempat minum





Gambar 4.1: Mikroskop Inverted  
(Untuk pemeriksaan, koleksi dan evaluasi oosit atau embrio pada petri dish)

#### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dilakukan mulai bulan Juli sampai Desember 1999.

#### 4.6 Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan Data

Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahap serta dalam tiga eksperimen.

##### 4.6.1 Penentuan Dosis Hesperitin

###### a. Untuk Eksperimen I:

Besar dosis pada eksperimen ini mengacu pada penelitian hesperidin, maka dosis pada penelitian ini adalah 0 mg/kg.BB, 31 mg/kg.BB, 41.5 mg/kg.BB dan 82.5 mg/kg.BB

b. Untuk Eksperimen II:

Besar dosis pada eksperimen ini dimulai dengan dosis hesperitin yang tertinggi yaitu 100 ppm (karena untuk penelitian *In vitro*: 100 ppm tidak efektif); 75 ppm, 50 ppm dan 25 ppm

c. Untuk Eksperimen III:

Besar dosis pada eksperimen ini penentuannya sama dengan dosis pada eksperimen II yaitu 0 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm

#### 4.6.2 Pembuatan Hesperitin

a. Untuk Eksperimen I:

Menimbang dengan teliti hesperitin sebanyak 3.627 mg, dilarutkan dalam 2.195 lt dengan aquabidest. Kemudian menimbang Carboxy Methyl Cellulose (CMC) 2 mg dalam 2 lt aquabidest

b. Untuk Eksperimen II:

Untuk membuat larutan induk 100 ppm, menimbang hesperitin dengan teliti per mg dalam 10 ml M16. Demikian juga untuk membuat sampel 75 ppm, yaitu mengambil 3.75 ml larutan induk ditambah 1.25 ml larutan media M16, dan seterusnya.

## c. Untuk Eksperimen III:

Pembuatannya sama dengan pada eksperimen II.

## 4.6.3 Tahap Persiapan meliputi:

## a. Penyediaan dan aklimatisasi hewan coba:

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari PUSVETMA, Surabaya. Sebelum mendapatkan perlakuan hewan coba diuji fertilitas untuk mengetahui bahwa hewan coba tersebut betul-betul fertil, dengan harapan homogenitas sampel dipertahankan yaitu meliputi berat badan, umur, strain, makanan dan keadaan lingkungan sekitarnya.

Tabel 1: Bahan M16.

NO	BAHAN	GR/ 100ML
1	NaCl	0,5333
2	KCl	0,0356
3	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,0252
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0162
5	Mg SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,0293
6	Na HCO <sub>3</sub>	0,2101
7	Na laktat 60%	284ul
8	Na piruvat	0,0036
9	Glukosa	0,1
10	BSA	0,4
11	Penicilin	0,006
12	Streptomisin	0,005
13	Aquabidest	100ml

b. Penyiapan larutan untuk eksperimen I:

Larutan hesperitin dibuat dengan berbagai dosis, adapun penentuan besarnya dosis hesperitin yang digunakan mengacu pada penelitian hesperidin (Bambang dkk, 1997)

Dalam penelitian ini dosis yang digunakan adalah 0 mg/kg.BB, 41.5 mg/kg.bb dan 82.5 mg/kg.BB.

c. Penyiapan larutan untuk eksperimen II:

Untuk menentukan dosis pada eksperimen ke II ini dimulai dengan menentukan dosis hesperitin yang tertinggi yaitu 100 ppm, sebab lebih dari 100 ppm tidak efektif untuk penelitian *In vitro* (Freshney, 1986) Pertama kali membuat larutan hesperitin dengan membuat larutan induk 100 ppm yaitu menimbang hesperitin dengan teliti 1 mg/10ml media M16. Demikian juga untuk membuat sampel 75 ppm dengan mengambil 3.75 ml larutan induk ditambah 1.25 ml media.

d. Penyiapan larutan hesperitin untuk eksperimen III:

Untuk menentukan dosis dan membuat larutan hesperitin sama dengan pada eksperimen ke II.

#### 4.6.4 Tahap Perlakuan yang meliputi:

##### a. Uji fertilitas untuk mencit jantan

Mencit jantan yang layak sebagai pejantan didasarkan pada kemampuannya untuk membuntingi mencit Betina. Mencit jantan dan betina yang digunakan untuk uji fertilitas masing-masing sebanyak 100 ekor. Mencit betina dilakukan super ovulasi di suntik dengan pMSG 5IU, setelah 48 jam disuntik dengan hCG 5IU, kemudian langsung dikawinkan secara monogamous pair mating. Setelah 17 jam kemudian dilakukan pemeriksaan vaginal plug. Pada betina yang terdapat vaginal plug dinyatakan positif kawin dan dibiarkan sampai melahirkan, dan pejantan pasangannya dinyatakan fertil maka pejantan inilah yang digunakan untuk penelitian.

##### b. Pengelompokan hewan coba

Hewan coba dikelompokkan dalam tiga eksperimen sebagai berikut:

##### Untuk Eksperimen I:

Pada eksperimen ke I ini pemberian hesperitin secara *In vivo*. Enam puluh ekor mencit jantan dikelompokkan menjadi 4 kelompok masing-masing kelompok sebanyak 15 ekor dengan dosis 0 mg/kg.BB/kg.BB (kelompok I), 31 mg/kg.BB/kg.BB (kelompok II), 41.5 mg/kg.BB/kg.BB (kelompok III) dan 82.5 mg/kg.BB/kg.BB (kelompok IV). Dosis yang diberikan disesuaikan

dengan berat badan mencit, oleh sebab itu selalu diadakan penimbangan berat badan mencit sebelum perlakuan, penimbangan ulang dilakukan setiap satu minggu sekali. Pemberian hesperitin per oral menggunakan alat suntik disposable yang dilengkapi jarum dengan ujung membulat dan tidak tajam. Pemberian hesperitin dilakukan setiap hari selama 52 hari pada masing-masing kelompok percobaan kemudian dilakukan pengujian secara *In vitro*.

#### Untuk Eksperimen II:

Pada eksperimen ke II ini pemberian hesperitin secara *In vitro* yaitu hesperitin ditambahkan pada media M16 dengan dosis 0 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm. Perlakuan pada eksperimen ke II ini sebagai berikut, dibuat drop-drop (25 mikroliter) pada petridish dari media M16 yang ditambahkan hesperitin sesuai dosis pada petridish dengan alat socorex kemudian dimasukkan ovum pada petridish menggunakan pipet pasteur yang terakhir ditambahkan spermatozoa.

#### Untuk Eksperimen III:

Pada eksperimen ke III ini pemberian hesperitin juga dilakukan secara *In vitro*, yaitu hesperitin ditambahkan media M16 dengan dosis 0 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm. Perlakuan pada eksperimen ketiga ini sebagai berikut, dibuat

drop-drop (25 mikroliter) pada petridish dari media M16 yang sudah ditambahkan hesperitin, kemudian dimasukkan ovum pada petridish menggunakan pipet pasteur dan terakhir ditetesi dengan hialuronidase. (1 mg/ml setara dengan 1,500mikroliter)

c. Koleksi Oosit dan fertilisasi *In vitro*

Mencit betina dilakukan super ovulasi dengan menyuntikkan 5 IU *hormon* PMSG dan empat puluh delapan jam kemudian disuntik 5 IU HCG, mencit langsung dikawinkan dengan pejantan yang telah divasektomi. Setelah tujuh belas jam dilakukan pemeriksaan *vaginal plug*, mencit betina yang terdapat *vaginal plug* dinyatakan positif kawin dan diambil untuk koleksi oosit. Oosit yang diambil dicuci tiga kali berturut-turut dengan PBS dan M16. Selanjutnya oosit dipindahkan ke dalam medium fertilisasi *In vitro* dan ditambahkan *spermatozoa* yang diambil dari *cauda epididimis* mencit jantan yang telah mendapat paparan *hesperitin*. Oosit yang telah bercampur dengan *spermatozoa* diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama empat jam kemudian dilakukan pengamatan terjadinya fertilisasi, dihitung jumlah sel granulosa dan keutuhan sel granulosa.



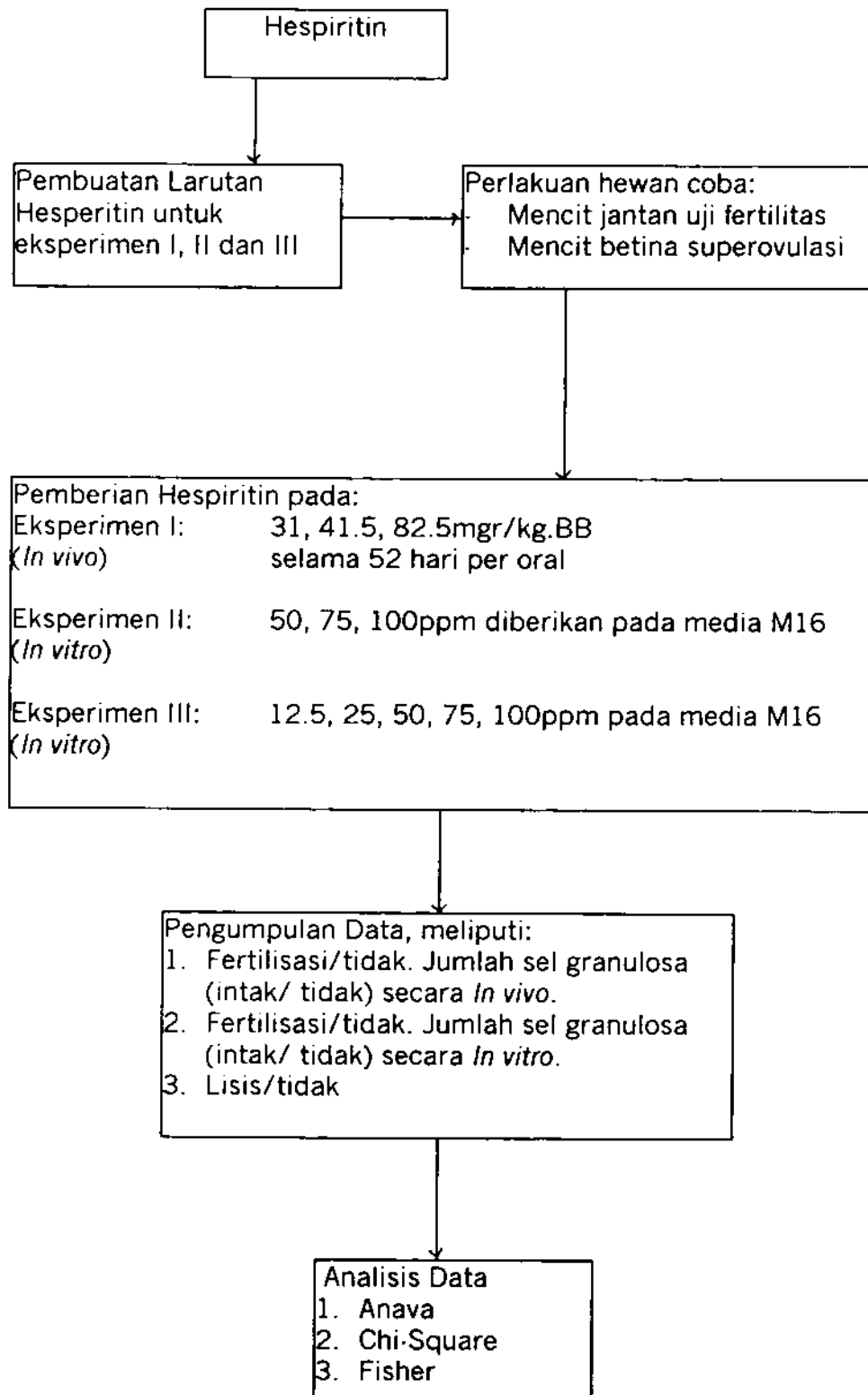
Gambar 4.2: Kantong fertilisasi dari mencit betina dilihat dengan alat mikroskop inverted

#### 4.7 Pengumpulan Data

Data-data yang dikumpulkan adalah sebagai berikut:

- a) Uji fertilitas
- b) Untuk fertilisasi yaitu fertilisasi, tidak fertilisasi. Jumlah sel granulosa (intak/tidak intak) pada pemberian hesperitin secara *In vivo*.
- c) Untuk fertilisasi yaitu fertilisasi, tidak fertilisasi. Jumlah sel granulosa (intak/tidak intak) pada pemberian hesperitin pada media M16 secara *In vitro*.
- d) Lisis/tidak pada pemberian hesperitin pada media M16 dan ditetesi hyaluronidase 1,500 mikroliter (1 mg/ml setara dengan 1,500 mikroliter).





Gambar 4.3: Kerangka Operasional Penelitian

#### 4.8 Teknik Analisis Data

Untuk menguji hipotesis tentang pemberian hesperitin terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit dengan melihat jumlah granulosa dalam berbagai dosis dan terjadinya fertilisasi. Sedangkan untuk mengetahui tentang media M16 yang ditetesi hyaluronidase dengan melihat sel granulosa lisis atau tidak. Penelitian ini diuji menggunakan analisis Varian, Chi-Square, kemudian untuk membandingkan perlakuan yang berbeda menggunakan uji Fisher.

Dalam penelitian ini dilakukan 3 jenis eksperimen dan dalam setiap kali perlakuan dilakukan sepuluh kali ulangan. Adapun rancangannya seperti tabel dibawah ini.

Tabel 2: Rancangan Penelitian

No	Jenis	Rancangan	Data	Kesimpulan
1	<i>In vivo</i>	Hespiritin per oral Ovum + SpA	Fertilisasi/tidak Jumlah Sel Granulosa (intak/tidak)	
2	<i>In vitro</i>	Hesperitin + Ovum + SpA	Fertilisasi/tidak Jumlah Sel Granulosa (intak/tidak)	
3	<i>In vitro</i>	Hespiritin + Ovum + Hialuronidase	Jumlah sel granulosa Lisis/Tidak lisis	

## BAB 5

### HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Hasil Uji Fertilitas Mencit Jantan

Hasil uji fertilitas mencit jantan dapat dilihat dari kemampuannya dalam menyebabkan terjadinya kebuntingan pada mencit betina pasangannya, dari 200 ekor mencit jantan yang dikawinkan maka yang dapat menyebabkan kebuntingan sebanyak 184 ekor. Dengan demikian maka pejantan yang dapat digunakan dalam penelitian ini adalah 184 ekor. (Lampiran 1).

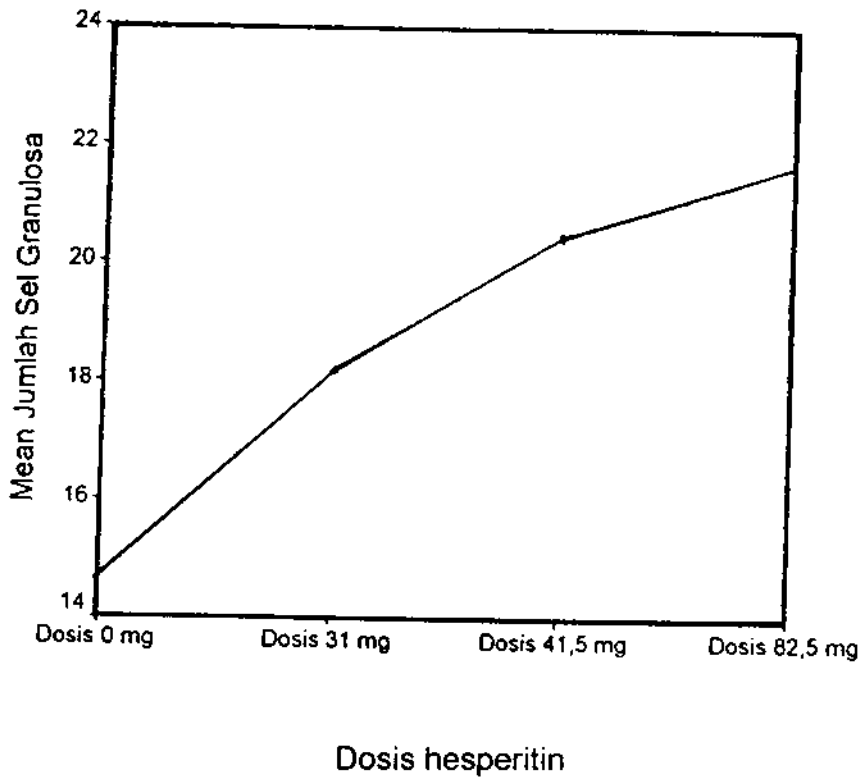
##### 5.1.2 Hasil Uji Hesperitin pada Eksperimen I

Setelah diberikan hesperitin secara *In vivo* yang diberikan per oral dengan dosis 0mg/kg.BB; 31mg/kg.BB; 41.5mg/kg.BB dan 82.5mg/kg.BB. Hesperitin diberikan selama 52 hari pada mencit jantan, maka diperoleh data seperti tercantum pada tabel 1

**Tabel 1: Data Pengaruh Pemberian Hesperitin secara *In Vivo* terhadap Jumlah Sel Granulosa, Mencit Betina.**

Dosis	Mean	Std. Deviation	N
0 mg	14.70	3.40	10
31 mg	18.20	12.22	10
41.5 mg	20.50	9.12	10
82.5 mg	21.70	14.58	10
Total	18.77	10.62	40

Berdasarkan data pada tabel tersebut setelah diuji menggunakan analisis variant terhadap jumlah sel granulosa maka dapat ditentukan F hitung = 0.831 dan F tabel = 2.84 (Lampiran 2)



Gambar 5.1: Grafik rata-rata jumlah sel granulosa dari mencit betina setelah pemberian heperitin dengan dosis 0 mg/kg.BB, 31 mg/kg.BB, 41.5 mg/kg.BB dan 82.5 mg/kg.BB.

Berdasarkan grafik di atas bahwa rata-rata jumlah sel granulosa menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna, demikian juga untuk angka fertilisasi.



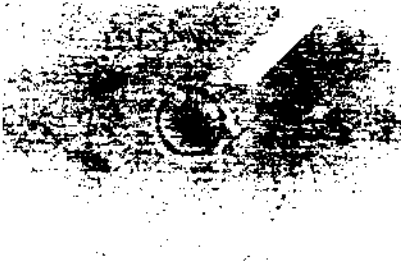
Gambar 5.2: Sel telur yang intak dari mencit betina (masih dikelilingi oleh Sel Granulosa), dilihat dengan mikroskop inverted.

Tabel 2 Data pengaruh pemberian hesperitin pada mencit jantan secara *In vivo* terhadap terjadinya fertilisasi dosis 0 mg/kg.BB, 31 mg/kg.BB, 41.5 mg/kg.BB dan 82.5 mg/kg.BB

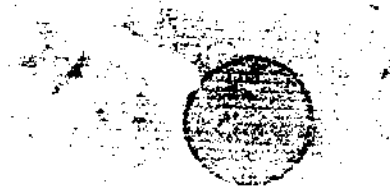
Dosis (mg)	Ulangan	Fertilisasi		Sel Granulosa	
		Fertilisasi	Tidak	intak	Tidak
0	10	10	0	0	10
31	10	9	1	1	9
41.5	10	9	1	1	9
82.5	10	9	1	1	9

Berdasarkan data pada table 1 ditentukan harga kritik  $X^2$  yang diperoleh = 1.081. Sedangkan  $X^2 (0.05) = 7.82$  (Lampiran 2)

a. Oosit dan Spermatozoa  
mencit



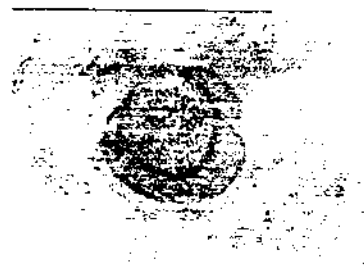
b. Sel telur mencit yang telah  
dibuahi oleh spermatozoa



c. Embrio mencit tahap 2 sel



d. Embrio mencit tahap 4 sel



Gambar 5.3: Proses pembuahan ovum oleh spermatozoa mencit, sampai terbentuknya embrio mencit tahap 4 sel (dilihat dengan alat mikroskop inverted)

### 5.1.3 Hasil uji hesperitin pada eksperimen II

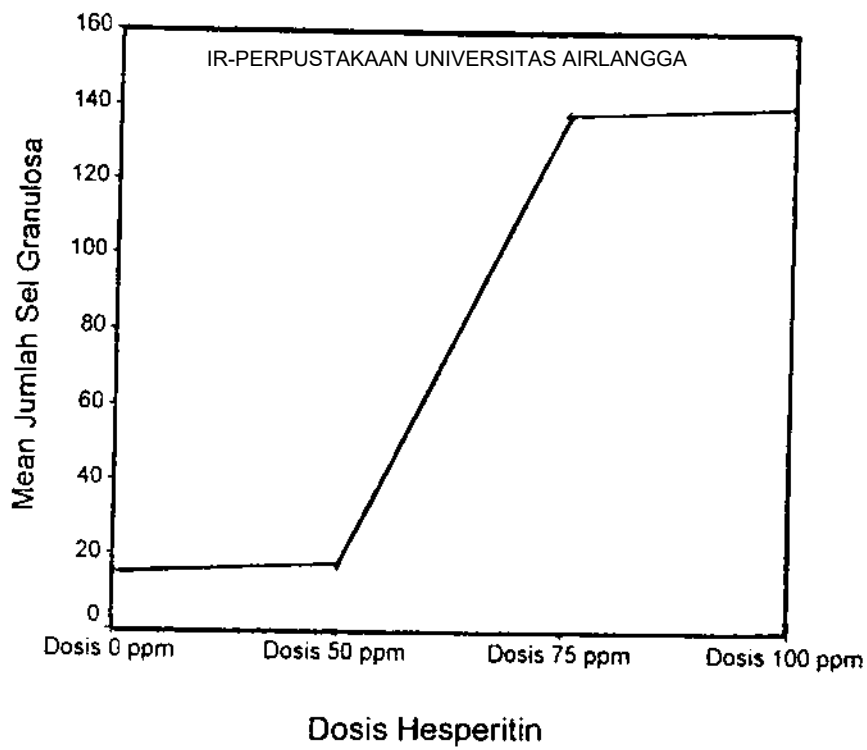
Pada eksperimen kedua ini yaitu uji hesperitin secara *In vitro*. Hesperitin ditambahkan pada media M16 dengan dosis 0 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm, maka diperoleh data seperti tercantum dalam tabel 3. Tabel 3 menunjukkan hasil pemberian hesperitin terhadap jumlah sel granulosa secara *In vitro* dengan dosis 0 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm.

**Tabel 3 Data Pengaruh Pemberian Hesperitin secara *In Vitro* terhadap Jumlah Sel Granulosa Mencit.**

Dosis	Mean	Std. Deviation	N
0 ppm	15.20	5.61	10
50 ppm	17.40	6.00	10
75 ppm	138.00	18.33	10
100 ppm	140.80	18.81	10
Total	77.85	63.73	40

Berdasarkan data pada tabel tersebut setelah diuji menggunakan analisis variant terhadap jumlah sel granulosa maka dapat ditentukan F hitung = 266.838 dan F tabel = 2.84 (Lampiran 3)





Gambar 5.4 Grafik rata-rata jumlah sel granulosa mencit setelah pemberian heperitin secara *in vitro* dengan dosis 0 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm.

Berdasarkan grafik di atas bahwa pada dosis 75 ppm dan 100 ppm menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna.

**Tabel 4** Data Pengaruh Pemberian Hesperitin secara *In vitro* terhadap fertilisasi dari mencit, dosis 0 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm.

Dosis (ppm)	Ulangan	Fertilisasi		Sel Granulosa	
		Fertilisasi	Tidak	Intak	Tidak
0	10	10	0	0	10
50	10	10	0	0	10
75	10	0	10	10	0
100	10	0	10	10	0

Berdasarkan data pada tabel 4 dapat ditentukan harga kritik  $X^2$  yang diperoleh = 40. Sedangkan  $X^2 (0.05) = 7.815$ ,  $X^2 (0.01) = 11.345$  (Lampiran 8)

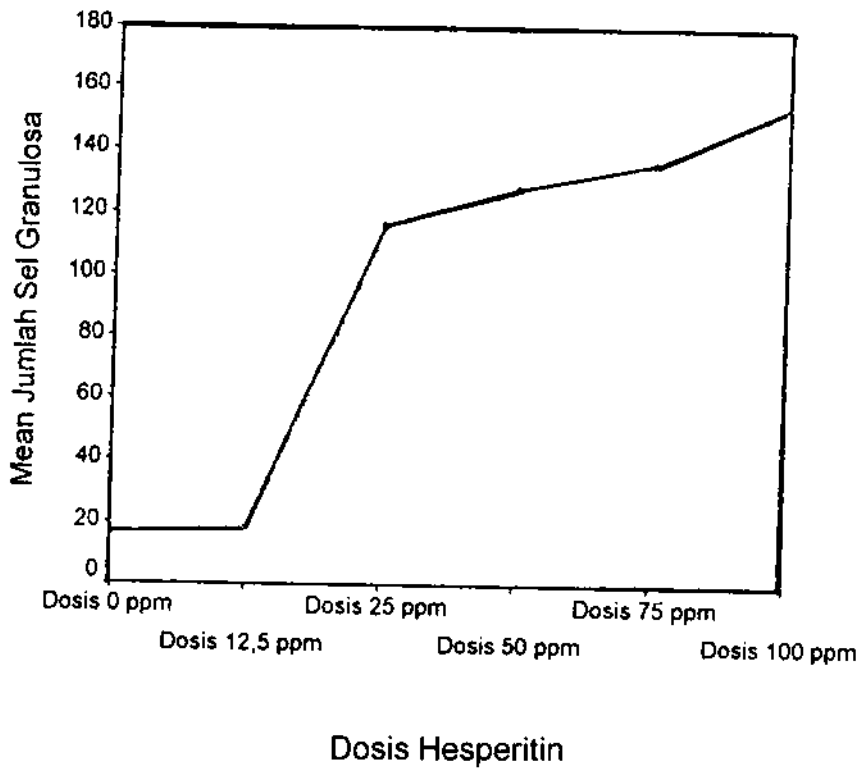
#### 5.1.4 Hasil Uji hesperitin pada eksperimen III

Pada eksperimen ketiga ini pemberian hesperitin pada M16 ditambah dengan enzim hialuronidase (1500 mikroliter), pengujiannya secara invitro, dengan dosis 0 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm. Maka diperoleh data seperti tercantum dalam tabel 5. Tabel 5 menunjukkan hasil pemberian hesperitin secara *In vitro* dengan dosis 0 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm.

**Tabel 5** Data Pengaruh Pemberian Hesperitin pada media M16 dan Hialuronidase diuji secara *In Vitro* terhadap Jumlah Sel Granulosa Mencit

Dosis	Mean	Std. Deviation	N
0 ppm	17.00	4.72	10
12.5 ppm	18.60	6.62	10
25 ppm	116.30	19.80	10
50 ppm	128.30	11.48	10
75 ppm	136.40	14.64	10
100 ppm	155.30	14.12	10
Total	95.32	57.84	60

Berdasarkan data pada tabel tersebut setelah diuji menggunakan analisis varian terhadap jumlah sel granulosa maka dapat ditentukan F hitung = 225.068 dan F tabel = 4.43 (Lampiran 5)



Gambar 5.5: Grafik rata-rata jumlah sel granulosa mencit setelah pemberian hesperitin pada media M16 ditambah hialuronidase diuji secara *in vitro* dengan dosis 0 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm.

Bedasarkan grafik di atas rata-rata jumlah sel granulosa pada dosis 25 ppm sampai 100 ppm menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna.

**Tabel 6** Data hasil pengaruh pemberian hesperitin dan hialuronidase pada media M16 terhadap terjadinya lisis diuji secara *In vitro* dari mencit dengan dosis 0 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm.

Dosis (ppm)	Ulangan	Sel Granulosa	
		Lisis	Tidak
0	10	10	0
12.5	10	10	0
25	10	0	10
50	10	0	10
75	10	0	10
100	10	0	10

Berdasarkan data pada tabel 6 dapat ditentukan harga kritik  $X^2$  yang diperoleh = 60. Sedangkan  $X^2 (0.05) = 11.070$ ,  $X^2 (0.01) = 15.086$  (Lampiran 10)

## 5.2 Analisis Hasil Penelitian

### 5.2.1 Eksperimen I

Analisis hasil penelitian tentang pengaruh pemberian hesperitin secara *in vivo* terhadap jumlah sel granulosa yang diuji menggunakan analisis varian.

Dari hasil analisis varian diperoleh angka F hitung = 0.831 dan F tabel = 2.84, karena F hitung < F tabel maka  $H_0$  diterima. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pemberian hesperitin selama 52 hari pada mencit jantan dengan dosis yang berbeda memberikan hasil yang sama atau tidak ada perbedaan. Sehingga dapat dikatakan bahwa dosis

hesperitin yang berbeda tidak dapat mempertahankan sel granulosa dalam keadaan intak (utuh) dan terjadi fertilisasi.

Tabel 7 Rangkuman analisis Chi-kuadrat untuk angka fertilisasi dari mencit *In vivo*

Kelompok	Fertilisasi	Tidak	Total
1	10	0	10
2	9	1	10
3	9	1	10
4	9	1	10
Total	37	3	40
Chi-square = 1.081      DF = 3      Prob = 0.7816			

$H_0$  : keempat dosis homogen dalam hal terjadinya fertilisasi.

$H_1$  : keempat dosis tidak homogen dalam hal terjadinya fertilisasi.

Melihat jumlah angka fertilisasi di antara kelompok 1, 2, 3, dan 4 setelah diuji dengan Chi-kuadrat menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna angka fertilisasi di antara kelompok tersebut  $P > 0.05$ . Hal ini berarti bahwa pemberian larutan hesperitin per oral selama 52 hari pada mencit jantan tidak dapat menurunkan angka fertilisasi.

### 5.2.2 Eksperimen II

Analisis hasil penelitian tentang pengaruh pemberian hesperitin pada media M16 secara *In vitro* terhadap jumlah sel granulosa diuji menggunakan analisis varian dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8 Rangkuman Analisis Varian untuk Jumlah Sel Granulosa mencit secara *In Vitro*.

Dosis	N	Subset	
		1	2
0 ppm	10	15.20 <sup>a</sup>	
50 ppm	10	17.40 <sup>a</sup>	
75 ppm	10		138.00 <sup>b</sup>
100 ppm	10		140.80 <sup>b</sup>
Sig.		.723	.652

$H_0$ : Pemberian dosis tidak berpengaruh terhadap jumlah sel granulosa mencit

$H_1$ : Pemberian dosis berpengaruh terhadap jumlah sel granulosa mencit

Dari hasil analisis varian diperoleh angka F hitung = 266.838 dan F tabel = 2.84, karena F hitung > F tabel maka  $H_0$  ditolak. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pemberian hesperitin pada Media M16 dengan dosis yang berbeda (50 ppm dan 75 ppm mempunyai notasi yang berbeda) dapat mempertahankan sel granulosa tetap intak (utuh).

**Tabel 9** Rangkuman analisis Chi-kuadrat untuk angka fertilisasi mencit, *In vitro*

Kelompok	Fertilisasi	Tidak	Total
1	10	0	10
2	10	0	10
3	0	10	10
4	0	10	10
Total	20	20	40
Chi-square = 40      DF = 3      Prob = 4.380			

- $H_0$  : keempat dosis homogen dalam hal terjadinya fertilisasi mencit  
 $H_1$  : keempat dosis tidak homogen dalam hal terjadinya fertilisasi mencit

Melihat jumlah angka fertilisasi di antara kelompok 1, 2, 3, dan 4 setelah diuji dengan Chi-kuadrat menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat bermakna angka fertilisasi di antara kelompok tersebut  $P < 0.05$  juga  $P < 0.01$ . Hal ini berarti bahwa pemberian larutan hesperitin pada Media M16 dapat menurunkan angka fertilisasi (Lampiran 9).

### 5.2.3 Eksperimen III

Analisis hasil penelitian tentang pengaruh pemberian hesperitin pada media M16 yang ditambaha dengan hialuronidase terhadap jumlah sel granulosa yang diuji menggunakan analisis varian dapat dilihat pada tabel 10



**Tabel 10 Rangkuman Analisis Varian untuk Jumlah Sel Granulosa mencit secara *In Vitro*.**

Dosis	N	Subset			
		1	2	3	4
0 ppm	10	17.00 <sup>a</sup>			
12.5 ppm	10	18.60 <sup>a</sup>			
25 ppm	10		116.30 <sup>b</sup>		
50 ppm	10			128.30 <sup>c</sup>	
75 ppm	10			136.40 <sup>c</sup>	
100 ppm	10				155.30 <sup>d</sup>
Sig.		.783	1.000	.167	1.000

$H_0$ : Pemberian dosis tidak berpengaruh terhadap jumlah sel granulosa mencit

$H_1$ : Pemberian dosis berpengaruh terhadap jumlah sel granulosa mencit

Dari hasil analisis varian diperoleh angka F hitung = 225.068 dan F tabel = 4.43, karena F hitung > F tabel maka  $H_0$  ditolak. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pemberian hesperitin pada Media M16 yang ditambah hialuronidase dengan dosis yang berbeda (12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm dan 100 ppm mempunyai notasi yang berbeda yaitu a, b, c dan d) dapat mempertahankan sel granulosa supaya tetap intak (utuh).

Tabel. 11 Rangkuman analisis Chi-kuadrat untuk angka terjadinya lisis dari sel granulosa mencit, secara *In vitro*

Kelompok	Lisis	Tidak	Total
1	10	0	10
2	10	0	10
3	0	10	10
4	0	10	10
5	0	10	10
6	0	10	10
Total	20	40	60
Chi-square = 60      DF = 5      Prob = 4.486			

$H_0$  : keenam dosis homogen dalam hal terjadinya lisis dari sel granulosa mencit

$H_1$  : keenam dosis tidak homogen dalam hal terjadinya lisis dari sel granulosa mencit

Melihat jumlah angka lisis di antara kelompok 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 setelah diuji dengan Chi-kuadrat menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna di antara ke enam kelompok tersebut  $P < 0.05$  dan  $P < 0.01$ . Hal ini menunjukkan bahwa penambahan hesperitin pada media M16 dapat mempertahankan sel granulosa supaya tetap tidak lisis.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pada Eksperimen I

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian hesperitin terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit secara *In vivo*, yaitu pemberian hesperitin per oral yang diberikan selama 52 hari.

Dosis yang diberikan adalah 0 mg/kg.BB, 31 mg/kg.BB, 41.5 mg/kg.BB dan 82.5 mg/kg.BB / kg BB. Berdasarkan dosis-dosis tersebut di atas maka hasil uji hesperitin secara *In vivo* tampak pada dosis 0 mg/kg.BB (kontrol) angka fertilisasi 10 setelah dilakukan uji *In vitro*, pada dosis 31 mg/kg.BB angka fertilisasi 9 demikian juga untuk dosis 41.5 mg/kg.BB dan 82.5 mg/kg.BB (Lihat tabel 1). Dari hasil analisis yang menggunakan Chi-kuadrat membuktikan bahwa pemberian larutan hesperitin per oral selama 52 hari tidak dapat menurunkan angka fertilisasi keadaan sel granulosa tidak intak dalam arti terjadi dispersi.

Kegagalan dalam menurunkan angka fertilisasi pada mencit jantan sebenarnya dapat disebabkan oleh adanya faktor proses penyerapan seperti dilaporkan oleh Ameer *et al.*, 1996 bahwa hesperidin diserap dari saluran gastro intestinal manusia setelah pemberian oral, diketemukan pada urin setelah pemberiannya.

Hal ini mungkin tidak tahan lingkungan asam dalam perut. Selain itu glikosida dalam usus dapat membelah residu gula, fraksi-fraksi yang tidak terhidrolisis tidak mengandung aglikon. Oleh sebab itu flavanone

urin diduga berasal dari metabolit hesperitin. Penggambaran penyerapan memberikan bukti bahwa flavanone yang diberikan secara oral mudah masuk ke enzim pemetabolisir obat pada usus. Para peneliti menarik kesimpulan bahwa naringin bukan konstituen yang bertanggung jawab terhadap interaksi obat. Peneliti tidak memperhatikan kalau masalah dosis dapat mempengaruhi hasil penelitian. (Ameer *et.*, 1996)

Suatu penelitian yang dilakukan oleh Bambang P. (2000) menyatakan bahwa hesperidin dapat menurunkan aktivitas enzim hialuronidase pada sperma mencit dan dapat mengganggu pada tingkat regulasi translasi.

Hasil penelitian ini walaupun terjadi fertilisasi namun dapat menghambat perkembangan embrio dalam medium kultur *In vitro*. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian hesperitin tidak berhasil menghambat kerja enzim hialuronidase pada fertilisasi *In vitro* dalam melisis sel-sel granulosa dari oosit. Apabila dilihat pada proses pemberian hesperitin per oral selama 52 hari, hal ini akan mengganggu proses spermatogenesis yaitu pada proses kapasitasi baik dikaput sampai cauda epididimis. Hal ini terbukti dengan terjadinya fertilisasi namun dapat menghambat proses perkembangan embrio dalam medium kultur.

Kegagalan dalam hambatan fertilisasi pada penelitian aktifitas model anti fertilitas yang menggunakan hesperitin diduga disebabkan karena sifat kelarutan obat. Obat di dalam tubuh akan berusaha menembus semua organ secara bergantian bersaing dengan jalur transpor zat lain. Ketika mencapai tempat aksi (reseptor sel) obat akan

memberikan respon biologik yang dikehendaki bila mengikat reseptor sel tersebut. Agar supaya mencapai tempat aksi seluler dan berikatan semua zat yang mempunyai aktifitas biologik harus mempunyai atau mencapai kelarutan dalam cairan ekstraseluler yang polar. Yaitu dengan cara-cara mengikat protein transpor dengan modifikasi atau secara enzimatis (Freshney, 1988). Hesperitin diduga tidak mampu mencapai reseptor yang terkait dalam aktivitasnya menghambat jalur enzim hialuronidase dalam proses penetrasi spermatozoa.

Oleh sebab itu sebelum melihat atau mengamati faktor dan kekuatan intraksi antara obat dengan reseptor, harus dipertimbangkan sifat-sifat fisikokimia yang mempunyai absorpsi, distribusi dan metabolisme obat. Dengan demikian dapat dijelaskan bahwa pada pemberian hesperitin per oral akan mengalami berbagai proses yaitu yang diawali dalam rongga mulut terjadi proses degradasi, absorpsi, dalam saluran cerna terjadi proses degradasi, absorpsi, distribusi dan metabolisme. Kemudian pada organ reproduksi (epididimis) di mana sperma tersebut disimpan apabila terjadi penetrasi obat kedalamnya ditentukan oleh adanya bobot molekulnya, koefisien partisipasinya dan ciri-ciri ion. Karena di dalam epididimis mengandung sistem enzim yang dapat mengaktifkan dan mendetoksikan yaitu meningkatkan dan menurunkan toksisitas bahan kimia. Jadi sewaktu sperma disimpan dalam epididimis telah dipengaruhi oleh bahan tersebut (Dixon, 1986). Pada penelitian ini digunakan CMC sebagai dispensator obat, yaitu pelarut dasar obat yang berbentuk suspensi. Sifat kelarutan obat ini akan dapat membantu

meningkatkan dengan mengadakan pemusingan pada kecepatan tinggi. (Wilson and Gisvold, 1982). Kelarutan obat dalam fase air dan lipid secara mutlak dan relatif di dalam tubuh merupakan sifat fisika yang sangat penting untuk memperoleh dan mempertahankan kadar obat yang efektif pada tempat aksi. Perubahan yang teratur dalam aktivitas biologik yang sering terjadi pada seri homolog merupakan contoh yang bermanfaat untuk memahami hubungan antara kelarutan dan sifat partisi dengan aksi obat.

Kegagalan hesperitin berikatan dengan reseptor mengakibatkan masih dilepaskannya enzim hialuronidase dari kepala spermatozoa pada saat fertilisasi, sehingga spermatozoa mampu membuahi oosit. Menurut Gilbert (1988) terjadinya fertilisasi dapat dilihat dengan sudah terbentuknya pronukleus jantan dan betina, adanya kepala spermatozoa dan ekor dalam oosit.

Dapat dijelaskan juga bahwa kegagalan hesperitin dalam menembus membran sel spermatozoa sehingga masih tertinggal dan menetap pada cairan ekstraselular. Pada saat koleksi sperma dari cauda epididimis, hesperitin yang tertinggal dan menetap pada cairan ekstraselular ikut terambil bersama yang selanjutnya akan dijatuhkan dalam medium fertilisasi *In vitro* dan medium kultur. Hal ini dapat dibuktikan setelah melakukan eksperimen kedua.

Seperti dikatakan di atas bahwa hesperitin gagal menembus membran sel granulosa dapat juga dikatakan bahwa hesperitin sudah menembus membran sel spermatozoa tetapi tidak berikatan dengan

reseptor inhibitor enzim hialuronidase, maka hesperitin akan dapat mempengaruhi atau mengganggu reaksi-reaksi metabolisme yang terjadi di dalam sitoplasma sel spermatozoa. Telah banyak dilaporkan tentang pengaruh senyawa-senyawa flavonoid lain pada metabolisme protein baik secara langsung maupun tidak langsung. Aktivitas flavonoid tersebut kemungkinan bisa terjadi pada hesperitin, mengingat semua senyawa flavonoid di dalam tubuh akan terhidrolisa seperti dilaporkan oleh Ameer *et al.*, (1996). Sedangkan aglikon-aglikon flavonoid dan hesperitin mempunyai rumus kimia yang hampir sama yaitu berupa fenol, perbedaan aglikon flavonoid dan hesperitin hanya terletak gugus metil dan atau hidroksil pada cincin dari fenol.

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian terdahulu terletak pada bahan yang digunakan dan dosis. Pada penelitian terdahulu digunakan bahan hesperidin merupakan senyawa glikosida flavanone sedangkan dalam penelitian ini digunakan bahan hesperitin yang merupakan senyawa aglikon dari hesperidin.

Dari hasil uji statistik terlihat tidak adanya perbedaan secara bermakna di antara perlakuan tersebut yaitu antara kelompok dosis terhadap jumlah sel granulosa dan terjadinya fertilisasi.

## 6.2 Eksperimen II

Pada eksperimen II ini pemberian hesperitin pada media M16 kemudian diuji secara *In vitro*. Pengamatan dilakukan pada fertilisasi atau tidak juga pada keadaan sel granulosa intak atau tidak. Pada eksperimen

II ini dosis yang diberikan yaitu 0 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm. Tolok ukur untuk melihat fertilisasi atau tidak seperti yang dikatakan oleh Gilbert (1988) yaitu dikatakan fertilisasi bila telah terbentuk pronukleus jantan dan betina, terdapatnya kepala sperma dan ekor pada inti.

Pada dosis 0 ppm, 50 ppm masih terjadi fertilisasi (tabel 4). Pengamatan dilakukan setelah 5 jam. Hal ini mempunyai arti bahwa pemberian hesperitin pada dosis 50 ppm tidak dapat menurunkan angka fertilisasi dan keadaan sel granulosa tidak intact (terdispersi). Berarti hesperitin pada dosis tersebut tidak dapat menghambat berkerjanya enzim hialuronidase yang spesifik, bekerja pada kumulus ooforus.

Dosis 75 ppm, dan 100 ppm, tidak terjadi fertilisasi dan keadaan sel granulosa tetap intact, jadi pemberian hesperitin pada media M16 pada dosis tersebut maka dikatakan dapat menghambat kerja dari enzim hialuronidase yang berada pada kepala spermatozoa selain itu terdapat enzim penetrasi coronary dan acrosin, masing-masing enzim mempunyai peranan penting dalam proses fertilisasi, ternyata spermatozoa dalam menggunakan masing-masing enzim secara berurutan untuk melewati seluruh lapisan yang berbeda dari sel telur. Bila enzim hialuronidase telah bekerja menghidrolisa kumulus ooforus maka enzim berikutnya akan disekresi untuk lapisan berikutnya dari sel telur. Sebaliknya bila daya kerja enzim hialuronidase dihambat tentunya tidak dapat menghidrolisa kumulus ooforus, yang akhirnya tidak terjadi penetrasi pada lapisan pertama dari ovum, tentunya tidak terjadi sekresi enzim berikutnya sehingga tidak terjadi fertilisasi (Patanelli, 1980).



Hasil penelitian yang mendukung pernyataan di atas, disajikan pada tabel 9 tentang jumlah angka fertilisasi dan keadaan sel granulosa. Melihat jumlah angka fertilisasi di antara kelompok tersebut setelah diuji dengan Chi-kuadrat menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna, hal ini berarti pemberian larutan hesperitin pada media M16 dapat menurunkan angka fertilisasi.

Hasil penelitian yang relevan dengan fenomena ini dikemukakan oleh Bambang *et al.*, (1997) bahwa penelitian model anti fertilitas yang menggunakan hesperidin diperoleh hasil yaitu pada kelompok perlakuan tidak terjadi fertilisasi di samping sel-sel kumulus yang masih utuh. Hal ini membuktikan bahwa hesperidin dapat digunakan sebagai inhibitor enzim hialuronidase yang spesifik.

Pada eksperimen II ini karena terdapat perbedaan yang bermakna diteruskan pada uji Fisher. Untuk membandingkan perlakuan terhadap frekuensi positif yang muncul, hasilnya adalah pada dosis 0 dan 75 mg, dosis 0 mg/kg.BB dan 100 mg/kg.BB, dosis 50 mg/kg.BB dan dosis 75 mg serta dosis 50 dan dosis 100 yang menunjukkan perbedaan.

### 6.3 Eksperimen III

Pada eksperimen III ini pemberian hesperitin ditambahkan pada media M16 dan hialuronidase diuji secara *In vitro* dengan dosis 0, 12.5, 25, 50 75 dan 100 ppm. Pada eksperimen ini tidak digunakan spermatozoa tetapi digunakan enzim hialuronidase hal ini untuk

mengetahui apakah pemberian hesperitin dapat menghambat aktifitas hialoronidase.

Hasil dari eksperimen III dapat dilihat pada tabel 13, bahwa pada kelompok 1 dan 2 keadaan sel granulosa lisis sesuai dengan pendapat dari Patanelli (1980) bahwa bila daya kerja dari enzim hialoronidase telah bekerja menghidrolisa kumulus ooforus. Hal ini berarti larutan hesperitin pada dosis tersebut dapat mempertahankan sel granulosa dalam keadaan tidak lisis.

Dengan model uji ini diharapkan hesperitin dapat masuk ke dalam cairan plasma dan selama spermatozoa kontak dengan hesperitin akan menurunkan aktivitas hialuronidase. Pada penelitian ini tidak dilakukan pada spermatozoa hasil ejakulat tetapi berasal dari epididimis.

Untuk kelompok 2, 3 dan 4 keadaan sel granulosa ternyata yang tetap utuh hal ini menunjukkan bahwa penambahan hesperitin pada media M16 dapat mempertahankan sel granulosa tetap utuh, dapat dikatakan bahwa larutan hesperitin pada dosis tersebut dapat menghambat bekerjanya enzim hialuronidase. Hal ini dapat dilihat dari keadaan sel granulosanya tidak lisis.

Setelah diuji dengan Chi-kuadrat menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna maka diteruskan pada uji Fisher (pada lampiran 11) bahwa perlakuan yang sangat bermakna adalah pada perlakuan 1 sampai perlakuan 6 dan perlakuan 2 sampai perlakuan 6.

## BAB 7

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 SIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh melalui serangkaian percobaan yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian hesperitin pada dosis 31 mg/kg.BB, 41.4 mg/kg.BB dan 82.5 mg/kg.BB secara *in vivo* tidak berpengaruh terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit, hal ini dapat diketahui dengan terjadinya fertilisasi dari sel telur mencit.
2. Dosis hesperitin 75, 100 ppm pada media M16 yang diuji secara *In vitro*, ternyata berpengaruh terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit, hal ini dapat diketahui dengan tidak terjadinya fertilisasi dari sel telur mencit.
3. Dosis hesperitin 50, 75, dan 100 ppm pada media M16 yang ditambah enzim hialuronidase, menunjukkan bahwa hesperitin berfungsi menghambat enzim hialuronidase.

#### 7.2 SARAN

Sebaiknya dilakukan penelitian ulang dengan dosis yang berbeda, baik secara *In vivo* maupun *In vitro*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amelar R D, Dubin L, Schoenfeld Cy, 1980. *Sperm Motility, Fertility Sterility*, 34 (3) : 197 – 215.
- Bailey D G, Arnold J M O, Strong H A, Munoz C, Spence J D, 1993. *Effect of Grape Fruit Juice and naringin on nisoldipin Pharmacokinetics*. *Clinarmacol Ther.* 54 : 589 – 594.
- Bambang Prayogo E.W., Widjiati, Hamdani dan Aucky H., 1997. Hambatan *Hesperidin* terhadap Penetrasi *Spermatozoa* Mencit dalam Proses Fertilisasi *In Vitro*. Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX, Yogyakarta.
- Barbara Ameer, Parm D, Randy A. Weintraub, Jodie V. Johnson, Richard A and Russell L. Rouseff, 1996. *Flavanon Absorption After naringin, hesperidin and citrus Administration*. *Clin Pharmacol Ther.* 60 : 34 – 40.
- Battersby S and Chandler J A, 1977. *Correlation between Elemental Composition and Motility of Human Spermatozoa, Fertility Sterility*. 28 : 557 – 561.
- Collier I G, Flower, 1971. *Effect of Aspirin on Human Seminal Prostaglandins*. *Lancet* 11 : 852.
- Dixon R L, 1986. *Toxic Responses of the Reproductive System in Klausen*. C D : Amdur M O : Dull. J (eds). *Toxicology* Maxmillan Publishing Company, New York.
- Eliasson R, Dorn Bush. K, 1977. *Levels of Trimethoprin and Sulphamethoxazole in Human Seminal Plasma*. *Andrology* 9 : 195.
- Fresney R I, 1986. *Culture of Animal Cell: A Manual of Basic Technique Second*. Ed. Alan R. Liss Inc. New York.
- Hafez ESE, 1980. *The Semen In: Human Reproduction, Conception and Contraception*. Second Edition, Hafez ESE, (Ed), Harper & Row Publishers, 19 – 103.
- Hardjowijoto S, 1992. *Kontrasepsi Mantap Pria*. Seminar KB Mutakhir. Surabaya.

- Joyce C L, Mack S R, Anderson R A, Zaneveld L J, 1986. *Effect of Hyaluronidase, Beta-glucuronidase and Beta-N-Acetylglucosaminidase Inhibitors on Sperm Penetration of Mouse Oocyte*. Biol Reprod. 2 : 336 – 346.
- Johnson M dan Barry, J.E., 1995. *Essential Reproduction, Department of Anatomy, University of Cambridge Follow Christ's College, Cambridge*.
- Jubiz W, Frailey J, 1973. *Seminal Fluid and Plasma Prostaglandin Responses to Aspirin in Normal Subjects*. Tertil Steril 24 : 977.
- Lee E S, Fujii Y and Fukui Y, 1998. *A Comparative Study on Developmental Capacity to Blastocysts Derived from 1 and 2 (3) Cell Bovine Embryos After In Vitro Maturation and Fertilization*. Ther 1157 – 1161.
- Li, MW, Yudin, AI, Vande Voort, C A, Sabeur, K, Primakoff, P and Overstreet, JW. 1997. *Inhibition of Monkey Sperm Hyaluronidase Activity and Heterologous Cumulus Penetrations by Flavonoid*. Biol Reprod, Jun 56: 6.p.1383-9
- Lim Y, Mahan, K. Latthrop, W F, Myles, D G and Primakoff P, 1992. *A Hyaluronidase Activity of the Sperm to Penetrate the Cumulus Cell Layer Surrounding the Egg*. The Journal of Cell Biology, Vol 125, P 1157 – 1163.
- Mann, T and Lutwak - Mann, C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen. Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*, Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Maschiah R, Fisch B, Eltes F, Tadir Y, Ovadia J, Bartoov B, 1992. *The Relationship between Sperm Ultra Structural Features and Fertilizing Capacity In Vitro, Fertility Sterility*, 57 : 1052 – 1057.
- Mitchel J A, Nelson L, Hafez E S E, 1976. *Mortality of Spermatozoa in Men*, Hafez E S E, (Ed), Mosby Co. St. Louis : 83 – 99.
- Nagal, T. Yanagimachi R, Srivastara P N, Yanagimachi H, 1986. *Acrosome Reaction in Human Spermatozoa, Fertility and Sterility*, 45 : 701 – 707.
- Padersen H, Fawcett, DD, 1976. *Functional Anatomy of Human Spermatozoa, In: Human Semen and Fertility Regulation in Men*, Hafez E S E (Ed), CV, Mosby Co. St. Louis, 133 – 143.

- Polakoski, K.L., and Zaneveld, L.J.D. *Proteinase Inhibitors in Andrology in Hafez Ed. Human Semen and Fertility in Men*. CV Mosby St. Louis London, 1976.
- Partodiharjo S, 1982. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Edisi 2. Mutiara Jakarta : 96 – 188.
- Paz (Frenkel) G, Scher H, Homonnai Tz, Campus A, Eylan E, 1979. *Absence in Human Ejaculate of Cephalixin Following Its Oral Administration*. Int J Andral 2 : 308.
- Robinson T, 1995. *The Organic Constituents of Higher Plants. Their Chemistry and Interrelationship*. 5<sup>th</sup> Ed. Cordus Press, PO Box 587, North Amhert, MA 0105, P 191 – 224.
- Smith L C and Wilmut I, 1994. *Control of Cleavage and Further Development In Vitro in Reconstituted Two-Cell Mouse Embryos*. Journal of Reproduction and Fertility. 100, P 323 – 329.
- Siegel T, Dudhilwilz A B, Fribery J, Suares M and Glucer M, 1986. *Inhibition of Sperm Motility and Aglutination of Sperm Cell by Free Fatty Acid in Whole Semen, Fertility Sterility* 45 : 273 – 279.
- Tournaye H, 1994. *The Effects of Pentoxifyline on Sperm Function and Embryonic Development and Its Use in Treatment of Male – Factor Invertility*, Thesis, Vrije Universiteit Beussel.
- Tollihere M R, 1980 *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Trease, G.E. and Evans, W.C., 1985. *Pharmacognosy*, 12th Edition, English Language Book Society London.
- Vane J R, 1971. *Inhibiton of Prostaglandine Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin Like Drug*. Natur New Biol. 231 : 232.
- WHO, 1992. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervival Mucus Interaction*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 3<sup>rd</sup> Edition.
- Zaneveld L J D, 1985. *The Biology of Spermatozoa*, Presented In: Kongress Nasional III Pandi, Jakarta : 15 – 39.

## Lampiran 1

## Hasil Uji Fertilitas Pejantan

NO	KODE PEJANTAN	HASIL	JML ANAK	NO	KODE PEJANTAN	HASIL	JML ANAK	NO	KODE PEJANTAN	HASIL	JML ANAK
1	B1	+	4	23	C16	+	6	45	B3	+	4
2	A25	+	4	24	C25	+	4	46	A10	+	4
3	A18	+	6	25	D22	+	4	47	B21	+	4
4	A13	+	4	26	A2	+	4	48	C20	+	4
5	A7	+	8	27	A6	+	2	49	D6	+	4
6	C1	+	6	28	B4	-	0	50	D25	+	4
7	D1	+	4	29	C2	+	2	51	A3	-	0
8	D5	+	4	30	C5	+	2	52	B5	+	2
9	D8	+	2	31	D7	-	0	53	C4	+	6
10	B2	+	2	32	D11	-	0	54	D9	+	2
11	B7	+	2	33	B10	+	8	55	D14	-	0
12	B18	+	6	34	A9	+	6	56	D10	+	2
13	A15	+	6	35	A17	+	6	57	B24	+	6
14	A19	+	6	36	B19	+	2	58	A12	+	6
15	A23	+	8	37	B23	+	2	59	A16	-	0
16	C17	+	2	38	B25	+	4	60	A24	+	4
17	D16	+	2	39	C22	+	2	61	C8	+	2
18	B15	-	0	40	C18	+	4	62	C6	+	2
19	A1	+	4	41	C10	-	0	63	D4	+	2
20	A21	+	4	42	D3	+	2	64	C13	+	2
21	B8	+	6	43	C3	+	6	65	C15	+	4
22	C11	+	6	44	A5	-	0	66	D17	+	4

NO	KODE PEJANTAN	HASIL	JML ANAK	NO	KODE PEJANTAN	HASIL	JML ANAK	NO	KODE PEJANTAN	HASIL	JML ANAK
67	D20	+	6	89	D15	+	2	111	B35	+	4
68	A4	+	6	90	D13	+	4	112	B47	+	2
69	B11	+	4	91	C14	+	4	113	D47	+	2
70	B9	+	2	92	B22	+	4	114	D46	+	2
71	D21	+	4	93	B14	-	0	115	B36	+	4
72	A11	+	2	94	B13	+	8	116	B48	+	4
73	A8	+	2	95	C9	+	6	117	D49	+	4
74	C12	+	4	96	D12	+	8	118	D50	+	4
75	D23	-	0	97	C7	+	8	119	D48	+	6
76	A12	+	4	98	C23	+	8	120	B37	+	8
77	A16	+	4	99	C19	+	8	121	A26	+	2
78	A24	+	4	100	A22	+	4	122	A49	+	4
79	B6	+	2	101	C38	-	0	123	A50	+	4
80	B20	+	2	102	D38	+	4	124	C27	+	6
81	C24	+	4	103	D40	+	4	125	C42	+	6
82	D19	+	6	104	B50	+	2	126	C48	+	6
83	C21	+	4	105	C50	+	2	127	C26	+	6
84	B17	+	2	106	C39	+	2	128	D27	+	6
85	A20	+	6	107	C47	+	2	129	D37	+	6
86	A14	+	6	108	D41	+	2	130	D39	+	2
87	D18	+	4	109	D44	+	4	131	D26	+	4
88	D24	-	0	110	D45	+	6	132	A27	+	4



NO	KODE PEJANTAN	HASIL	JML ANAK	NO	KODE PEJANTAN	HASIL	JML ANAK	NO	KODE PEJANTAN	HASIL	JML ANAK
133	A42	+	4	157	B49	+	6	181	D34	+	4
134	A48	+	4	158	B27	+	6	182	D36	+	4
135	A43	+	2	159	B31	+	4	183	C33	+	4
136	A28	+	2	160	B29	+	2	184	C46	+	2
137	A44	+	2	161	A30	+	4	185	D29	+	2
138	A29	+	2	162	A39	+	4	186	D35	+	2
139	C34	+	6	163	A41	+	2	187	B34	+	6
140	C37	+	8	164	A40	+	2	188	B41	+	6
141	C41	+	8	165	A45	+	2	189	B45	+	2
142	C35	+	4	166	C30	+	2	190	B42	+	6
143	C40	-	0	167	A31	+	2	191	A35	-	0
144	C36	+	2	168	A36	+	6	192	A38	+	2
145	D31	+	2	169	A37	+	8	193	C28	+	6
146	D33	+	4	170	A46	+	8	194	C43	+	4
147	D43	+	2	171	A32	+	6	195	C29	+	4
148	D32	+	4	172	C31	+	6	196	B28	+	6
149	D42	-	0	173	C44	+	6	197	B30	+	6
150	D30	+	4	174	C49	+	4	198	C43	+	4
151	B39	+	2	175	A33	+	4	199	B46	+	4
152	B43	+	2	176	A34	+	4	200	B28	+	4
153	B38	+	2	177	A47	+	2		B30	+	4
154	B44	+	4	178	C32	+	2		B33	+	4
155	B40	+	4	179	C45	+	2		B46	+	2
156	B26	+	6	180	D28	+	2		B32	+	2

## Lampiran 2

DATA PENGARUH PEMBERIAN HESPERITIN SECARA IN VIVO  
TERHADAP JUMLAH SEL GRANULOSA

UL.	DOSIS 0 mg		DOSIS 31 mg		DOSIS 41.5 mg		DOSIS 82.5 mg	
	JML SEL GRANULOSA	FERT	JML SEL GRANULOSA	FERT.	JML SEL GRANULOSA	FERT.	JML SEL GRANULOSA	FERT.
1	18	-	24	-	21	-	15	-
2	22	-	10	-	18	-	14	-
3	13	-	12	-	11	-	25	-
4	17	-	8	-	15	-	59	+
5	15	-	9	-	28	-	11	-
6	12	-	49	+	14	-	32	-
7	12	-	21	-	42	+	13	-
8	14	-	14	-	18	-	18	-
9	11	-	13	-	24	-	13	-
10	13	-	22	-	14	-	17	-

DATA PENGARUH PEMBERIAN HESPERITIN SECARA IN VITRO  
TERHADAP JUMLAH SEL GRANULOSA

UL.	DOSIS 0 ppm		DOSIS 50 ppm		DOSIS 75 ppm		DOSIS 100 ppm	
	JML SEL GRANULOSA	FERT	JML SEL GRANULOSA	FERT.	JML SEL GRANULOSA	FERT.	JML SEL GRANULOSA	FERT.
1	9	-	16	-	155	+	174	+
2	17	-	18	-	123	+	128	+
3	22	-	22	-	146	+	150	+
4	18	-	9	-	169	+	169	+
5	16	-	13	-	147	+	129	+
6	14	-	17	-	150	+	137	+
7	25	-	14	-	137	+	122	+
8	7	-	25	-	115	+	138	+
9	13	-	28	-	121	+	118	+
10	11	-	12	-	117	+	143	+

DATA PENGARUH PEMBERIAN HESPERITIN DAN HIALURONIDASE  
SECARA IN VITRO TERHADAP JUMLAH SEL GRANULOSA

UL.	DOSIS 0 ppm		DOSIS 12.5 ppm		DOSIS 25 ppm		DOSIS 50 ppm	
	JML SEL GRANULOSA	LISIS/ TIDAK	JML SEL GRANULOSA	LISIS/ TIDAK	JML SEL GRANULOSA	LISIS/ TIDAK	JML SEL GRANULOSA	LISIS/ TIDAK
1	12	-	23	-	79	+	119	+
2	24	-	28	-	112	+	135	+
3	18	-	14	-	129	+	129	+
4	9	-	25	-	137	+	117	+
5	17	-	13	-	88	+	123	+
6	13	-	9	-	121	+	142	+
7	22	-	22	-	117	+	151	+
8	19	-	24	-	142	+	124	+
9	21	-	11	-	115	+	128	+
10	15	-	17	-	123	+	115	+

DATA PENGARUH PEMBERIAN HESPERITIN DAN HIALURONIDASE  
SECARA IN VITRO TERHADAP JUMLAH SEL GRANULOSA

UL.	DOSIS 75 ppm		DOSIS 100 ppm	
	JML SEL GRANULOSA	LISIS/ TIDAK	JML SEL GRANULOSA	LISIS/ TIDAK
1	124	+	184	+
2	142	+	138	+
3	115	+	154	+
4	123	+	169	+
5	158	+	159	+
6	155	+	147	+
7	127	+	162	+
8	139	+	138	+
9	148	+	148	+
10	132	+	154	+

## Lampiran 3

## Pengaruh Pemberian Hesperitin Secara In Vivo Terhadap Jumlah Sel Granulosa

### Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Dosis 1	Dosis 0 mg	10
2	Dosis 31 mg	10
3	Dosis 41,5 mg	10
4	Dosis 82,5 mg	10

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Jumlah Sel Granulosa

Dosis	Mean	Std. Deviation	N
Dosis 0 mg	14.70	3.40	10
Dosis 31 mg	18.20	12.22	10
Dosis 41,5 mg	20.50	9.12	10
Dosis 82,5 mg	21.70	14.58	10
Total	18.77	10.62	40

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlah Sel Granulosa

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	284.675	3	94.892	.831	.486
Intercept	14100.025	1	14100.025	123.495	.000
DOSIS	284.675	3	94.892	.831	.486
Error	4110.300	36	114.175		
Total	18495.000	40			
Corrected Total	4394.975	39			

## Crosstabs (Hesperitin Secara In Vivo)

### Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Fertilitas * Dosis	40	100.0%	0	.0%	40	100.0%

**Fertilitas \* Dosis Crosstabulation**

			Dosis				Total
			Dosis 0 mg	Dosis 31 mg	Dosis 41,5 mg	Dosis 82,5 mg	
Fertilitas	Fertilisasi	Count	10	9	9	9	37
		Expected Count	9.3	9.3	9.3	9.3	37.0
	Tidak Fertilisasi	Count	0	1	1	1	3
		Expected Count	.8	.8	.8	.8	3.0
Total	Count		10	10	10	10	40
	Expected Count		10.0	10.0	10.0	10.0	40.0

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.081	3	.782
N of Valid Cases	40		

## Lampiran 4

## Pengaruh Pemberian Hesperitin Secara In Vitro Terhadap Jumlah Sel Granulosa

### Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Dosis 1	Dosis 0 ppm	10
2	Dosis 50 ppm	10
3	Dosis 75 ppm	10
4	Dosis 100 ppm	10

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Jumlah Sel Granulosa

Dosis	Mean	Std. Deviation	N
Dosis 0 ppm	15.20	5.61	10
Dosis 50 ppm	17.40	6.00	10
Dosis 75 ppm	138.00	18.33	10
Dosis 100 ppm	140.80	18.81	10
Total	77.85	63.73	40

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlah Sel Granulosa

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	151599.500	3	50533.167	266.838	.000
Intercept	242424.900	1	242424.900	1280.113	.000
DOSIS	151599.500	3	50533.167	266.838	.000
Error	6817.600	36	189.378		
Total	400842.000	40			
Corrected Total	158417.100	39			

## Post Hoc Tests

### Homogeneous Subsets

#### Jumlah Sel Granulosa

Duncan<sup>a,b</sup>

Dosis	N	Subset	
		1	2
Dosis 0 ppm	10	15.20	
Dosis 50 ppm	10	17.40	
Dosis 75 ppm	10		138.00
Dosis 100 ppm	10		140.80
Sig.		.723	.652

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 189.378.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

b. Alpha = .05.

## Crosstabs (Hesperitin Secara In Vitro)

#### Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Fertilitas * Dosis	40	100.0%	0	.0%	40	100.0%

#### Fertilitas \* Dosis Crosstabulation

			Dosis		
			Dosis 0 ppm	Dosis 50 ppm	Dosis 75 ppm
Fertilitas	Fertilisasi	Count	10	10	0
		Expected Count	5.0	5.0	5.0
	Tidak Fertilisasi	Count	0	0	10
		Expected Count	5.0	5.0	5.0
	Total	Count	10	10	10
		Expected Count	10.0	10.0	10.0

**Fertilitas \* Dosis Crosstabulation**

			Dosis	
			Dosis 100 ppm	Total
Fertilitas	Fertilisasi	Count	0	20
		Expected Count	5.0	20.0
	Tidak Fertilisasi	Count	10	20
		Expected Count	5.0	20.0
Total	Count		10	40
	Expected Count		10.0	40.0

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	40.000	3	.000
N of Valid Cases	40		



## Lampiran 5

## Pengaruh Pemberian Hesperitin dan Hialuronida Secara In Vitro Terhadap Jumlah Sel Granulosa

### Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Dosis 1	Dosis 0 ppm	10
2	Dosis 12,5 ppm	10
3	Dosis 25 ppm	10
4	Dosis 50 ppm	10
5	Dosis 75 ppm	10
6	Dosis 100 ppm	10

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Jumlah Sel Granulosa

Dosis	Mean	Std. Deviation	N
Dosis 0 ppm	17.00	4.76	10
Dosis 12,5 ppm	18.60	6.62	10
Dosis 25 ppm	116.30	19.80	10
Dosis 50 ppm	128.30	11.48	10
Dosis 75 ppm	136.40	14.64	10
Dosis 100 ppm	155.30	14.12	10
Total	95.32	57.84	60

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlah Sel Granulosa

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	188329.883	5	37665.977	225.068	.000
Intercept	545116.017	1	545116.017	3257.269	.000
DOSIS	188329.883	5	37665.977	225.068	.000
Error	9037.100	54	167.354		
Total	742483.000	60			
Corrected Total	197366.983	59			

## Post Hoc Tests

### Homogeneous Subsets

#### Jumlah Sel Granulosa

Duncan<sup>a,b</sup>

Dosis	N	Subset			
		1	2	3	4
Dosis 0 ppm	10	17.00			
Dosis 12,5 ppm	10	18.60			
Dosis 25 ppm	10		116.30		
Dosis 50 ppm	10			128.30	
Dosis 75 ppm	10			136.40	
Dosis 100 ppm	10				155.30
Sig.		.783	1.000	.167	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 167.354.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

b. Alpha = .05.

## Crosstabs (Hesperitin Dan Hialuronidase Secara In Vitro)

#### Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Fertilitas * Dosis	60	100.0%	0	.0%	60	100.0%

#### Fertilitas \* Dosis Crosstabulation

			Dosis			
			Dosis 0 ppm	Dosis 12,5 ppm	Dosis 25 ppm	Dosis 50 ppm
Lisis	Count		10	10	0	0
	Expected Count		3.3	3.3	3.3	3.3
Tidak Lisis	Count		0	0	10	10
	Expected Count		6.7	6.7	6.7	6.7
Total	Count		10	10	10	10
	Expected Count		10.0	10.0	10.0	10.0

**Fertilitas \* Dosis Crosstabulation**

		Dosis		Total
		Dosis 75 ppm	Dosis 100 ppm	
Lisis	Count	0	0	20
	Expected Count	3.3	3.3	20.0
Tidak Lisis	Count	10	10	40
	Expected Count	6.7	6.7	40.0
Total	Count	10	10	60
	Expected Count	10.0	10.0	60.0

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	60.000	5	.000
N of Valid Cases	60		

## Lampiran 6

Hasil Pengujian Hesperitin secara *In vivo*  
terhadap Fertilisasi

$H_0$  : keempat dosis homogen dalam hal terjadinya fertilisasi

$H_1$  : keempat dosis tidak homogen dalam hal terjadinya fertilisasi

$$\begin{aligned} X^2 &= \frac{(10 - 9.25)^2}{9.25} + \frac{(0 - 0.75)^2}{0.75} + \frac{(9 - 9.25)^2}{9.25} + \dots + \frac{(1 - 0.75)^2}{0.75} \\ &= 1.081 \end{aligned}$$

$$X^2 (0.05) = 7.815$$

Karena  $1.081 < 7.815$ ,  $H_1$  ditolak pada taraf 0.05 ( $P > 0.05$ ) jadi keempat dosis homogen atau tidak berbeda nyata.

## Lampiran 7

Hasil Pengujian Hesperitin secara *In vivo*

## terhadap Keadaan Sel Granulosa

$H_0$  : keempat dosis homogen dalam hal keadaan sel granulosa

$H_1$  : keempat dosis tidak homogen dalam hal keadaan sel granulosa

$$\begin{aligned} X^2 &= \frac{(0 - 0.75)^2}{0.75} + \frac{(10 - 9.25)^2}{9.25} + \frac{(1 - 0.75)^2}{0.75} + \dots + \frac{(9 - 9.25)^2}{9.25} \\ &= 1.081 \end{aligned}$$

$$X^2 (0.05) = 7.815$$

Karena  $(0.05) = 7.815$ ,  $H_1$  ditolak pada taraf 0.05 ( $P > 0.05$ ) jadi keempat dosis homogen atau tidak berbeda nyata.

## Lampiran 8

Hasil Pengujian Hesperitin secara *In vitro*  
terhadap Fertilisasi

$H_0$  : keempat dosis homogen dalam hal terjadinya fertilisasi

$H_1$  : keempat dosis tidak homogen dalam hal terjadinya fertilisasi

$$\begin{aligned} X^2 &= \frac{(10-5)^2}{5} + \frac{(0-5)^2}{5} + \frac{(10-5)^2}{5} + \dots + \frac{(10-5)^2}{5} \\ &= 40 \end{aligned}$$

$$X^2 (0.05) = 7.815$$

$$X^2 (0.01) = 11.345$$

Karena  $40 > 7.815$  dan  $40 > 11.345$  maka  $H_0$  ditolak pada taraf (0.05),  $P < 0.05$  juga pada taraf (0.01),  $P < 0.01$  maka keempat dosis tidak homogen atau berbeda nyata.

## Lampiran 9

Hasil Pengujian Hesperitin secara *In vitro*

## terhadap Keadaan Sel Granulosa

$H_0$  : keempat dosis homogen terhadap keadaan sel granulosa

$H_1$  : keempat dosis tidak homogen terhadap keadaan sel granulosa

$$\begin{aligned} X^2 &= \frac{(10-5)^2}{5} + \frac{(0-5)^2}{5} + \frac{(10-5)^2}{5} + \dots + \frac{(10-5)^2}{5} \\ &= 40 \end{aligned}$$

$$X^2 (0.05) = 7.815 \quad \text{dan} \quad X^2 (0.01) = 11.345$$

Karena  $40 > 7.8$  dan  $40 > 11.345$

$H_0$  ditolak pada taraf 0.05 ( $P < 0.05$ ) dan pada taraf 0.01 ( $P < 0.01$ ) maka keempat dosis tidak homogen atau berbeda nyata.

## Lampiran 10

## Hasil Pengujian Hesperitin dan Hialuronidase

secara *In vitro* terhadap Fertilisasi

$H_0$  : keenam dosis homogen dalam hal terjadinya fertilisasi

$H_1$  : keenam dosis tidak homogen dalam hal terjadinya fertilisasi

$$\begin{aligned} X^2 &= \frac{(10 - 3.33)^2}{3.33} + \frac{(10 - 6.67)^2}{6.67} + \frac{(10 - 3.33)^2}{3.33} + \dots + \frac{(10 - 6.67)^2}{6.67} \\ &= 60 \end{aligned}$$

$$X^2 (0.05) = 11.070 \quad \text{dan} \quad X^2 (0.01) = 15.086$$

Karena  $60 > 11.070$  dan  $60 > 15.086$

$H_0$  ditolak pada taraf (0.05),  $P < 0.05$  dan pada taraf (0.01),  $P < 0.01$  maka keenam dosis tidak homogen atau berbeda nyata.



## Lampiran 11

## Pengujian Fisher (Djarwanto, 1987)

Pada uji Chi-kuadrat yang berbeda nyata (tidak homogen) diteruskan dengan Fisher Test. Dalam hal ini membandingkan perlakuan A dan B terhadap frekuensi (+) yang muncul.

	+	-	Jumlah
A	A	c	a + c
B	B	d	b + d
Jumlah	a + b	c + d	T

$H_0$  : frekuensi (+) pada A < B

$H_1$  : frekuensi (+) pada A > B

$$P = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{T! a! b! c! d!}$$

Penerimaan:

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima, frekuensi (+) A > B berbeda nyata

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima, frekuensi (+) A < B tidak berbeda nyata

1. Hesperitin *In vitro* terhadap fertilisasi dan keadaan sel granulosa

1.1 Dosis 0 ppm dibandingkan dengan 50 ppm

$$H_0 : \text{dosis 0 ppm} < \text{dosis 50 ppm}$$

$$H_1 : \text{dosis 0 ppm} > \text{dosis 50 ppm}$$

$$P = \frac{10! 0! 10! 20!}{20! 10! 10! 0! 0!} = 1$$

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima sehingga dosis 0 ppm < dosis 50 ppm.

1.2 Dosis 0 ppm dibandingkan dengan 75 ppm

$$H_0 : \text{dosis 0 ppm} < \text{dosis 75 ppm}$$

$$H_1 : \text{dosis 0 ppm} > \text{dosis 50 ppm}$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 0! 10! 0!} = 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima sehingga dosis 0 ppm > dosis 50 ppm.

1.3 Dosis 0 ppm dibandingkan dengan 100 ppm

$$H_0 : \text{dosis 0 ppm} < \text{dosis 100 ppm}$$

$$H_1 : \text{dosis 0 ppm} > \text{dosis 100 ppm}$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!} = 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima sehingga dosis 0 ppm > dosis 100 ppm.

## 1.4 Dosis 0 ppm dibandingkan dengan 75 ppm

$H_0$  : dosis 50 ppm < dosis 75 ppm

$H_1$  : dosis 50 ppm > dosis 75 ppm

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima sehingga dosis 50 ppm > dosis 75 ppm.

## 1.5 Dosis 50 ppm dibanding dengan dosis 100 ppm

$H_0$  : dosis 50 ppm < dosis 100 ppm

$H_1$  : dosis 50 ppm > dosis 100 ppm

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima, sehingga dosis 50 ppm > dosis 100 ppm.

## 1.6 Dosis 75 ppm dibandingkan dengan dosis 100 ppm

$H_0$  : dosis 75 ppm < dosis 100 ppm

$H_1$  : dosis 75 ppm > dosis 100 ppm

$$P = \frac{10! 10! 10! 20!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 1$$

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima sehingga dosis 75 ppm < dosis 100 ppm.

## 2. Hesperitin dan Hialuronidase

## 2.1 Perlakuan 1 dibanding dengan perlakuan 2

$$H_0 : P_1 < P_2$$

$$H_1 : P_1 > P_2$$

$$P = \frac{20! 0! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!} = 1$$

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima.

## 2.2 Perlakuan 1 dibanding dengan perlakuan 3

$$H_0 : P_1 < P_3$$

$$H_1 : P_1 > P_3$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!} = 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima.

## 2.3 Perlakuan 1 dibanding dengan perlakuan 4

$$H_0 : P_1 < P_4$$

$$H_1 : P_1 > P_4$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!} = 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima.

## 2.4 Perlakuan 1 dibanding dengan perlakuan 5

$$H_0 : P_1 < P_5$$

$$H_1 : P_1 > P_5$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima.

## 2.5 Perlakuan 1 dibanding dengan perlakuan 6

$$H_0 : P_1 < P_6$$

$$H_1 : P_1 > P_6$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima.

## 2.6 Perlakuan 2 dibanding dengan perlakuan 3

$$H_0 : P_2 < P_3$$

$$H_1 : P_2 > P_3$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima.

## 2.7 Perlakuan 2 dibanding dengan perlakuan 4

$$H_0 : P_2 < P_4$$

$$H_1 : P_2 > P_4$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima.

## 2.8 Perlakuan 2 dibanding dengan perlakuan 5

$$H_0 : P_2 < P_5$$

$$H_1 : P_2 > P_5$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima.

## 2.9 Perlakuan 2 dibanding dengan perlakuan 6

$$H_0 : P_2 < P_6$$

$$H_1 : P_2 > P_6$$

$$P = \frac{10! 10! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 0.0000054$$

$P < 0.05$ , maka  $H_1$  diterima.

## 2.10 Perlakuan 3 dibanding dengan perlakuan 4

$$H_0 : P_3 < P_4$$

$$H_1 : P_3 > P_4$$

$$P = \frac{0! 20! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!} = 1$$

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima.

## 2.11 Perlakuan 3 dibanding dengan perlakuan 5

$$H_0 : P_3 < P_5$$

$$H_1 : P_3 > P_5$$

$$P = \frac{0! 20! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!} = 1$$

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima.

## 2.12 Perlakuan 3 dibanding dengan perlakuan 6

$$H_0 : P_3 < P_6$$

$$H_1 : P_3 > P_6$$

$$P = \frac{0! 20! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!} = 1$$

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima.

## 2.13 Perlakuan 4 dibanding dengan perlakuan 5

$$H_0 : P_4 < P_5$$

$$H_1 : P_4 > P_5$$

$$P = \frac{0! 20! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 1$$

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima.

## 2.14 Perlakuan 4 dibanding dengan perlakuan 6

$$H_0 : P_4 < P_6$$

$$H_1 : P_4 > P_6$$

$$P = \frac{0! 20! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 1$$

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima.

## 2.15 Perlakuan 5 dibanding dengan perlakuan 6

$$H_0 : P_5 < P_6$$

$$H_1 : P_5 > P_6$$

$$P = \frac{0! 20! 10! 10!}{20! 10! 10! 0! 0!}$$

$$= 1$$

$P > 0.05$ , maka  $H_0$  diterima.



## Lampiran 12

## Kesimpulan dari Uji Fisher

A	B	A	b	c	d	P	Yang Diterima	Kesimpulan
D0	D50	10	0	10	20	1	H <sub>0</sub>	Tidak Berbeda
D0	D75	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
D0	D100	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
D50	D75	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
D50	D100	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
D75	D100	10	10	10	20	1	H <sub>0</sub>	Tidak Berbeda
P1	P2	20	0	10	10	1	H <sub>0</sub>	Tidak Berbeda
P1	P3	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
P1	P4	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
P1	P5	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
P1	P6	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
P2	P3	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
P2	P4	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
P2	P5	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
P2	P6	10	10	10	10	0.0000054	H <sub>1</sub>	Berbeda <sup>*)</sup>
P3	P4	0	20	10	10	1	H <sub>0</sub>	Tidak Berbeda
P3	P5	0	20	10	10	1	H <sub>0</sub>	Tidak Berbeda
P3	P6	0	20	10	10	1	H <sub>0</sub>	Tidak Berbeda
P4	P5	0	20	10	10	1	H <sub>0</sub>	Tidak Berbeda
P4	P6	0	20	10	10	1	H <sub>0</sub>	Tidak Berbeda
P5	P6	0	20	10	10	1	H <sub>0</sub>	Tidak Berbeda